

Ein neuartiges biologisches Verfahren zur Vitamin D₃-Bestimmung

Manfred Baumeister

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553805_0030

Ein neuartiges biologisches Verfahren zur Vitamin D₃-Bestimmung

Manfred Baumeister

Aus den Instituten für Tierphysiologie
und Ernährungsphysiologie
in der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstände: Prof. DDr. DDr.h.c. Johannes Brüggemann
Prof. DDr. Jürgen Tiews

Ein neuartiges biologisches Verfahren zur Vitamin D₃-Bestimmung



Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Manfred Baumeister
aus Dürnau

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Prof. DDr. DDr. h. c. J. Brüggemann

Korreferent: Prof. Dr. I. Gylstorff

Tag der Promotion: 23. 2. 1973

Meinen Eltern

Inhaltsübersicht

1. Einleitung	1
2. Vitamin D	3
2.1. Chemische und physikalisch-chemische Methoden der Vitamin D-Bestimmung	6
2.1.1. Physikalische Methode: Spektrophotometrische Bestimmung	7
2.1.2. Chemische Methoden:	8
2.1.2.1. Antimontrichlorid als Reagens	8
2.1.2.2. Zinndichlorid als Reagens	10
2.1.3. Chromatographische Verfahren:	11
2.1.3.1. Papierchromatographie	11
2.1.3.2. Gaschromatographie	12
2.1.3.3. Gas-Flüssigchromatographie	14
2.2. Biologische Methoden der Vitamin D-Bestimmung	15
2.2.1. Grundlagen	15
2.2.1.1. Line-Test	17
2.2.1.2. Knochenaschentest	18
2.2.1.3. Cholecalciferolnachweis mit Küken	19
2.2.1.4. Röntgenmethode	20
2.2.1.5. ^{32}P -Methode	22
2.3. Vergleichende Betrachtung	24
3. Eigene Untersuchungen über Vitamin D ₃ -Bestimmung im biologischen Verfahren an der japanischen Wachtel	28
3.1. Methodik	28
3.1.1. Tiermaterial	28
3.1.2. Depletion	29
3.1.3. Haltung der Versuchstiere	30
3.1.4. Herstellung der Rationen	31
3.1.5. Methodik der Eischalentrockengewichtsbestimmung	32
3.1.6. Auswertung der Ergebnisse	32
3.2. Versuch I	37
3.2.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung	37
3.2.2. Ergebnisse	38
3.3. Versuch II	41
3.3.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung	41
3.3.2. Ergebnisse	42

3.4. Versuch III	46
3.4.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung	47
3.4.2. Ergebnisse	48
3.5. Versuch IVA	51
3.5.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung	51
3.5.2. Ergebnisse	52
3.6. Versuch IVB	55
3.6.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung	55
3.6.2. Ergebnisse	56
3.7. Versuch V	61
3.7.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung	61
3.7.2. Ergebnisse	61
3.8. Versuch VI	65
3.8.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung	65
3.8.2. Ergebnisse	65
3.9. Versuch VII	69
3.9.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung	70
3.9.2. Ergebnisse	70
4. Diskussion	75
4.1. Vergleich verschiedener Standardkurven	75
4.2. Vergleich verschiedener Standarddosierungen und Versuchsperioden	78
4.3. Fehlerquellen der Vitamin D ₃ -Bestimmung	83
4.4. Verhalten bei vermuteten Schadfällen	85
4.5. Futterverzehr, Körpergewichtsentwicklung und Tierverluste	87
4.6. Schlußfolgerungen	87
5. Zusammenfassung	89
5.1. Summary	92
6. Literatur	95
7. Lebenslauf	106

E I N L E I T U N G

In den letzten dreißig Jahren hat es nicht an Versuchen gefehlt, die bewährten, aber aufwendigen biologischen Bestimmungsmethoden für Vitamin D durch chemisch-physikalische Analysen zu ersetzen. Chemische Vitamin D-Bestimmungsmethoden setzen in der Regel hohe Vitamin D-Konzentrationen im Untersuchungsmaterial, wie sie meist nur in Konzentraten oder bestrahlten Produkten vorliegen, voraus. Die Methoden sind in vielen Fällen nicht allgemein anwendbar und müssen je nach Probenmaterial modifiziert werden. Deshalb kann auf die biologischen Verfahren zur Zeit noch nicht völlig verzichtet werden, auch wenn an der Verbesserung der Empfindlichkeit chemischer und physikalischer Methoden intensiv weiter gearbeitet wird. Die auf der Rachitis-heilenden oder verhütenden Eigenschaft des Vitamin D beruhenden biologischen Bestimmungsverfahren werden zumeist an Ratten und Küken durchgeführt.

In den letzten Jahren hat die japanische Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) als Labortier zunehmend an Bedeutung gewonnen. Als Ursachen für die häufige Verwendung der Wachtel als Versuchstier können geringer Platz- und Futterbedarf, kurze Brutdauer, schnelle Gewichtsentwicklung des Wachtelküken, früher Eintritt der Legereife im Alter von 5-6 Wochen sowie die zwischen 2. und 6. Lebensmonat kontinuierlich hohe Legeleistung angesehen werden (71).

Zur Aufrechterhaltung dieser hohen Legeleistung ist die Wachtel auch bei optimalem Calcium- und Phosphorverhältnis in der Nahrung auf eine zusätzliche Vitamin D-Zufuhr angewiesen. Werden Wachtelhennen mit einer Vitamin D₃-armen Basalration ernährt, so sinkt schon nach wenigen Tagen die Legeleistung, zunehmend werden dünnchalige und schalenlose Eier beobachtet (66). Der Einfluß von Vitamin D₃ auf Legeleistung und Eischalencalcifikation läßt sich nach ZUCKER und GROPP (1968) als Calciumausscheidung über die Eischale pro Tier und Tag messen.

Im Anschluß an eine Vitamin D_3 -Depletionszeit von ca. 14-21 Tagen besteht bei suboptimalem Vitamin D_3 -Angebot bereits nach 5-10 Tagen eine direkte lineare Beziehung zwischen Eischalen-Calciumausscheidung (pro Henne und Tag) und der Vitamin D_3 -Aufnahme, ausgedrückt als Vitamin D_3 -Konzentration im Futter. ZUCKER und GROPP haben 1968 vorgeschlagen, diese Korrelation zum Aufbau eines Vitamin D_3 -Bestimmungsverfahrens zu nutzen. Da der Calciumanteil der Eischale auch bei unterschiedlichen Schalengewichten nahezu konstant bleibt, konnte der Parameter Eischalen-Calciumausscheidung durch den Begriff Eischalentrockengewicht ersetzt werden (77).

Aus diesem Grunde wurde mir an den Instituten für Tierphysiologie und Ernährungsphysiologie in der Tierärztlichen Fakultät der Universität München die Aufgabe übertragen, ein entsprechendes Verfahren zur Vitamin D_3 -Bestimmung in Futtermitteln an der japanischen Wachtel zu entwickeln und dessen Brauchbarkeit an einer Reihe von handelsüblichen Mischfuttertypen und Milchnahrungsmitteln für Säuglinge zu überprüfen.

2. Vitamin D(3,25,24,60)

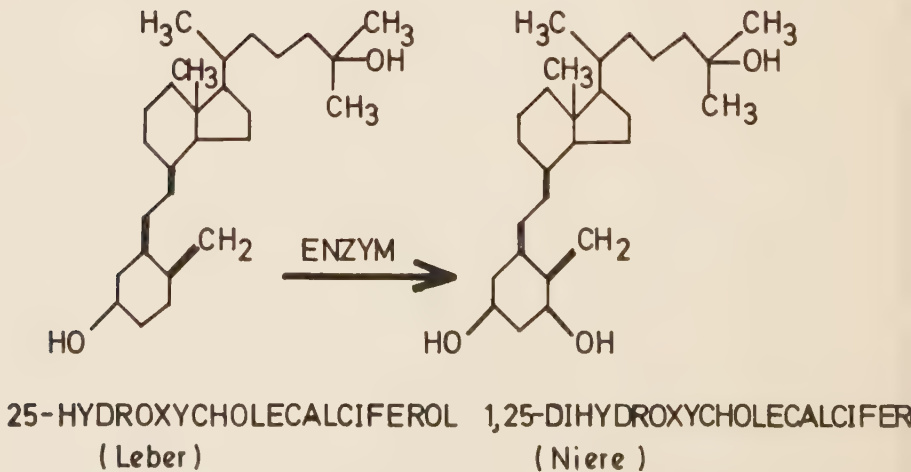
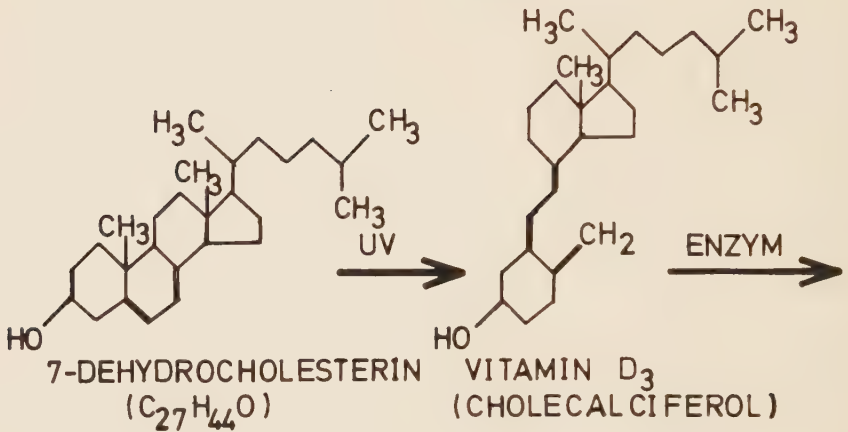
Die D-Vitamine gehören zur Gruppe der Sterine. Sie entstehen aus den im Pflanzen- und Tierreich vorkommenden Provitaminen, Ergosterin und 7-Dehydrocholesterin durch UV- oder Sonnenlichtbestrahlung. Von insgesamt 7 Vitamin D-Formen werden nur die biologisch wirksamsten Vertreter, Vitamin D₂ (Ergocalciferol) und Vitamin D₃ (Cholecalciferol) zu therapeutischen Zwecken verwendet. Die Vitamine D₂ und D₃ unterscheiden sich in ihrer chemischen Konstitution nur wenig.

Die D-Vitamine fördern die Resorption von Calcium aus dem Darmlumen. Nach neueren Vorstellungen von TAYLOR und WASSERMAN (1967) induzieren die Calciferole im Bürstensaum des Dünndarmerithels die Bildung eines calciumbindenden Transport-(Carrier)-Proteins. In der Folgezeit wurde das Carrier-Protein auch aus dem Uterus von Legehennen isoliert (CORRADINO et al., 1968).

Als zusätzliche Ursache für den rasch einsetzenden Calciumtransport unter Vitamin D-Einfluß fanden MARTIN et al. (1969) die Stimulierung einer sogenannten calciumabhängigen ATP-ase. Vitamin D scheint somit, die Synthese bzw. Stimulierung von zwei Proteinen (Ca-Transportprotein und Ca-abhängige ATP-ase) zu regeln, die beide zusammen den aktiven Calciumtransport durch die lumenseitige Epithelmembran bewirken.

Parallel mit den Versuchen zur Aufklärung der Wirkungsweise der Calciferole verlief die Suche nach der eigentlichen Wirkungsform. So wurden einige Hydroxy-Derivate der Vitamine D₂ und D₃ (DeLUCA, 1966) sowie ein wasserlösliches Vitamin D-Sulfat in Kuh- und Hummilch (SAFARI et al., 1967) gefunden. Als wirksamer Metabolit scheint 25-Hydroxycholecalciferol zu fungieren (BLUNT et al., 1968); daneben wurde noch ein stärker polarer Vitamin D-Metabolit von HOLICK et al., (1971) als 1, 25-Dihydroxycholecalciferol aus Kükendarm identifiziert. (Vergleiche Abbildung 1). Während letztere Substanz die stoffwechselaktive Form beim Calciumtransport durch den Duodenalbürstensaum zu sein scheint, besitzt 25-Hydroxycholecalciferol eine überlegene antirachitische Aktivität bei der Ratte. Als Bildungsstätte für das Dihydroxy-Derivat aus dem in der Leber gebildeten 25-OH-Derivat hat nach FRASER und KODICEK (1970) allein die Niere zu gelten.

Abb.:1 Formelbilder des Vitamin D₃, des Provitamin D₃ und der im Stoffwechsel aktiven Metaboliten.



Jenseits des Darmes begünstigt Vitamin D die Reabsorption von PO_4 -Ionen in den Nierentubuli, und vermindert damit die Ausscheidung von Phosphat im Harn. Bis vor kurzem wurde dieser Effekt direkt dem Vitamin D zugeschrieben. In letzter Zeit aber häufen sich die Meinungen, daß die vermehrte Rückresorption von Phosphat das Ergebnis eines sekundären Hyperparathyreoidismus ist, da diese Erscheinung bei parathyreoid-ektomierten Tieren nach Verabreichung von physiologischen Dosen Vitamin D nicht beobachtet wird (24).

Über den dritten Angriffspunkt des Vitamin D im Organismus ist bekannt, daß es am Transport und am selektiven Einbau der Calcium- und Phosphatsalze in die organische Matrix des Knochens beteiligt ist. Vitamin D-Mangel führt beim jugendlichen Tier zum Bild der Rachitis mit Verbiegungen der Röhrenknochen und Epirhysenaufreibungen im Bereich der Gelenke. In späteren Lebensabschnitten kann der bereits mineralisierte Knochen durch vermehrte Osteoklastentätigkeit wieder entkalken und zu Spontanfrakturen neigen.

Darüberhinaus beobachteten TURF und McGINNIS (1964) als typische Vitamin D-Mangelsymptome bei Legehennen ein Zurückgehen der Legeleistung, erhöhtes Vorkommen schalenloser, inclusive Bruch Eier, vermindertes Eigewicht sowie in 16,5% aller Eier von Vitamin D-Mangelhennen Blutflecken im Eidotter. Damit sind die Calciferole beim Vogel neben der Calciumresorption und der Mineralisation des Skeletts zusätzlich für die Eischalencalcifizierung verantwortlich.

Bei der Wachtelhenne besteht die Eischale zu 90-94% aus CaCO_3 , das seinerseits 40% Calcium enthält. Pro Ei (ca. 10,5 g) werden durchschnittlich 350 mg Calcium ausgeschieden.

In ihrer antirachitischen Wirkung beim Vogel bestehen zwischen Ergocalciferol und Cholecalciferol quantitative Unterschiede. Nach Angaben von JELINEK (1964) sind 1 I.E. Vitamin D_3 und 33 I.E. Vitamin D_2 in der Heilung der Hühnerrachitis wirkungsäquivalent. Bei DeMAN (1967) betrug das entsprechende Verhältnis 1:35, während dagegen bei CHEN und BOSMAN (1964) das Wirkungsverhältnis mit 1:8 bzw. 1:11 wesentlich enger lag.

Beim Säugetier waren keine Wirkungsunterschiede bekannt, bis KARG (1953) in vergleichenden Rattenversuchen ein Wirkungsverhältnis von 3:4, also eine um ca. 33% höhere Wirksamkeit des Vitamin D₃ fand. Allein auf Grund dieser unterschiedlichen Wirkungsintensität war es früher möglich, Vitamin D₂ und Vitamin D₃ voneinander zu unterscheiden.

Unabhängig hiervon ist die Internationale Einheit (I.E.) definiert als

1 I.E. Vitamin D₂ = 0,025 mcg Ergocalciferol und

1 I.E. Vitamin D₃ = 0,025 mcg Cholecalciferol.

Im Folgenden sollen die am meisten verwendeten Vitamin D-Bestimmungsverfahren einander gegenüber gestellt, und die jeweiligen Vor- und Nachteile hervorgehoben werden.

2.1. Chemische und physikalisch-chemische Methoden der Vitamin D-Bestimmung:

Alle Bestimmungsmethoden müssen außerordentlich spezifisch und ausreichend empfindlich sein, um reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Eine der Hauptschwierigkeiten in der Vitamin D-Analytik resultiert aus der Ähnlichkeit des Vitamin D mit Vitamin A in seinen chromogenen Eigenschaften bei Farbreaktionen wie mit SbCl₃ und auch im ähnlichen Adsorptionsverhalten beider Verbindungen bei chromatographischen Reinigungsschritten. Für die Abtrennung der störenden Stoffe sind verschiedene säulenchromatographische, papierchromatographische und dünnschichtchromatographische Verfahren ausgearbeitet worden (54,55).

Vitamin D-Konzentrationen im biologischen Material unterliegen großen Schwankungen, über die Tabelle 1 orientiert. Nur in einem Teil der dort beispielhaft aufgeführten Nahrungs- bzw. Futtermittel konnte Vitamin D bisher chemisch (bzw. physikalisch) analytisch bestimmt werden.

Tabelle 1: Vitamin D-Gehalt in Nahrungs- und Futtermitteln (I.E./kg)

Sommermilch	20-50
Wintermilch	3-20
Butter (Sommer)	400-1200
Leber (Kalb, Schwein)	200-1000
Dorschlebertran	50000-300000
Eigelb	1500-4000
Kleeheu	100-1000
(Blutserum Mensch	75 I.E./100 ml (AVICOLI et al., 1966)
	110 I.E./100 ml (WARKANY und MABON, 1940)

2.1.1. Physikalische Methode

Die spektrophotometrische Bestimmung:

Die drei konjugierten Doppelbindungen von Ergocalciferol und Cholecalciferol geben in der spektrophotometrischen Bestimmung in Äthanol ein UV-Absorptionsmaximum bei 264,5 nm. Bei diesem Nachweisverfahren wird von einer 25% Äthanol enthaltenden Lösung, deren Vitamin D-Konzentration zwischen 0,5 und 1,5 mg/100 ml liegt, die Absorption bestimmt.

Voraussetzung für die Zuverlässigkeit der Methode ist, daß in der zu untersuchenden Probe keine anderen bei 264,5 nm absorbierenden Komponenten enthalten sind. Das Verfahren ist deshalb nur wenig spezifisch, da andere Bestrahlungsprodukte (z.B. Tachysterin, Lumisterin) bei 264,5 nm ebenfalls absorbierend wirken und so in den bestimmten Vitamin D-Gehalt der Probe fälschlicherweise miteingehen. Gleiches wie für die genannten Bestrahlungsprodukte der Provitamine D gilt auch für Vitamin A. Nach KNOBLOCH (1964) kann diese Methode für die Bestimmung in Vitamin-Konzentraten nach Verseifung der Probe und Einschaltung der Adsorptionschromatographie (zur Abtrennung von Vitamin A) benutzt werden. Durch diese Aufarbeitung sind aber gleichzeitig Verluste an Vitamin D bedingt. Die spektrophotometrische Bestimmung der D-Vitamine ist daher mit vielen Fehlerquellen behaftet, und nur in sehr beschränkten Fällen wie bei Vorliegen reiner Vitamin D-Präparationen anwendbar. Sie kann nach GSTIRNER (1965) nur bei Vitamin Konzentraten (Arzneimittel, tierische Öle) mit mindestens 3000 I.E. Vitamin D./g zur Anwendung gebracht werden.

Eine Erhöhung der Spezifität der spektrophotometrischen Bestimmung ist durch Isomerisierung des Vitamin D möglich. Nach VERLOOF et al. (1955) läßt sich das partiell auch in cis-Form vorliegende Vitamin D in die all-trans-Form isomerisieren, womit eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 264,5 nm nach 270 nm und eine Erhöhung der Extinktion verbunden ist. Die Isomerisierung wird durch Fluoreszenzlicht begünstigt.

Dieses Verhalten wurde von E.B.DECFENE (1964) für eine Vitamin D-Bestimmung herangezogen, die sich auch in öli-ger Lösung von reinem Vitamin D in nicht zu geringer Kon-zen-tration und ohne Vitamin A-Gehalt ausführen läßt. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß keine chroma-tographische Reinigung des Vitamin D nötig ist und damit keine Verluste auftreten.

2.1.2. Chemische Methoden

2.1.2.1. Antimontrichlorid als Reagens:

Die chemischen Bestimmungsverfahren gehen auf die von CARR und PRICE (1926) für Vitamin A beschriebene Farbreaktion mit Antimontrichlorid zurück, die von BROCKMANN und CHEN (1936) auch auf die Vitamine D₂ und D₃ übertragen wurde. Der orange-gelbe Farbkomplex, den diese beiden Vitamine in Chloroform mit Antimontrichlorid bilden, zeigt nach 5-15 Minuten, je nach Temperatur, eine maximale Absorptionsbande bei 500 nm, die dem Lambert-Beer'schen Gesetz folgt und somit eine quanti-tative colorimetrische Auswertung ermöglicht.

Die Hauptschwierigkeit liegt dabei in der geringen Haltbar-keit der Reagentien von BROCKMANN und CHEN. Zur Erhöhung der Stabilität des Reagens hat sich nach C.H.NIELD und Mit-arb. (1940) ein Zusatz von 1,5-5,0% Acetylchlorid als brauch-bar erwiesen. Die Reaktion erreicht dann bei 20 °C schon in-nerhalb von 1-2 Minuten ihr Maximum. Dieses Reagens wird als Antimontrichlorid-Acetylchlorid-Reagens (AAR) bezeichnet.

Die Methode ist 5 mal empfindlicher als die spektrographische Bestimmung, d.h. es können Mengen bis zu 10 I.E. Vitamin D₃/g Untersuchungsmaterial gemessen werden (33).

Nach DeWITT und SULLIVAN (1946) ist das Reagens noch immer sehr hygroskopisch und auch von veränderlicher Empfindlich-keit. Die Autoren lösen deshalb Antimontrichlorid und Acetyl-chlorid in Dichloräthan. Diese Methode wurde auch im USP XVI ("Pharmacopoeia of the United States") aufgenommen.

* entspricht etwa dem deutschen DAB (Deutsches Arzneibuch)

BRÜGGEMANN und Mitarb. (1952, 1953, 1954) konnten sowohl für die CARR-PRICE-, als auch für die BROCKMANN-CHEN- Reaktion nachweisen, daß der eigentliche Farbträger einen Komplex zwischen dem Vitamin und Antimonpentachlorid - letzteres liegt im normalen SbCl_3 zu etwa 0,06% vor - darstellt. Davon ausgehend entwickelten sie ein neues Vitamin D- (und auch Vitamin A-) Bestimmungsverfahren, das im Gegensatz zu den bisher üblichen mit wesentlich geringeren Mengen Reagens auskommt, wodurch eine Verdünnung der Chloroform-Lösung weitgehend vermieden wird.

Trotz aller Verbesserungen dieser Methode ist als Nachteil nicht zu übersehen, daß Antimontrichlorid und auch Antimonpentachlorid nicht streng spezifisch mit den D-Vitaminen reagieren, da andere Bestrahlungsprodukte der Provitamine D, z.B. Tachysterin, Lumisterin mit SbCl_3 ebenfalls einen orangefarbenen Farbkomplex bilden. Eine signifikante Interferenz tritt aber nur auf, wenn deren Konzentration ca. das 30 fache der Konzentration des Vitamin D beträgt (43). Besondere Schwierigkeiten bei der Vitamin D-Bestimmung bereitet das Vorkommen von Vitamin A in der Probe, das unter intensiver Blaufärbung mit Antimontrichlorid reagiert und in Fischleberölen und in Arzneimitteln mit Vitaminzusätzen meist in einer vielfachen Menge des D-Vitamins vorliegt.

Um eine genaue Messung zu erhalten, muß das Vitamin D weitgehend gereinigt vorliegen. Nach TIEWS (1951) sollen mindestens 800-1000 I.E. D_3 in 10-20 g Ausgangsmaterial enthalten sein.

Um die im biologischen Material reichlich vorkommenden störenden anderen Sterine und das Vitamin A abzutrennen, sind aufwendige und zeitraubende Arbeitsgänge erforderlich, die dann notwendigerweise auch zu mehr oder weniger großen Vitamin D-Verlusten führen. Aus diesem Grunde sind in den letzten Jahren die verschiedensten chromatographischen Verfahren mit wechselndem Erfolg zur Abtrennung der fettlöslichen Vitamin D-Fraktion herangezogen worden.

So wurde die erstmalige Verwendung der Verteilungschromatographie zur Isolierung der Vitamin D-Fraktion damit begründet, daß sämtliche auf der Anwendung der Adsorptionschromatographie beruhenden Methoden mit dem großen Nachteil von erheblichen Vitamin D-Verlusten behaftet seien (40). Als Trägermaterial dienen hier Celite (Diatomeenerde) mit Polyäthylenglykol als stationäre Phase und Isooctan als mobile Phase. Nach der Trennung wird die reine Vitamin D-Fraktion mit Antimontrichlorid bestimmt. Der Vorteil dieser Methode liegt in einer guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Nachteilig wirkt sich aus, daß einige Retinolabbauprodukte ebenfalls mit Vitamin D eluiert werden und deshalb mit Florex XXS (Fuller- oder Bleicherde aus Florida) abgetrennt werden müssen.

Wesentliche Fortschritte wurden auch durch die Einführung der Dünnschichtchromatographie erzielt. Eine Reihe von Arbeiten behandelt die Abtrennung des Vitamin D aus Gemischen der fettlöslichen Vitamine auf Kieselgelplatten zum Zwecke eines qualitativen oder quantitativen Nachweises (8, 54, 55, 57). Die reine Vitamin D-Fraktion wird eluiert und mit Hilfe der Antimontrichlorid-Reaktion quantitativ bestimmt. BOLLIGER (1962) konnte auf diese Weise 100 I.E. Vitamin D₂/25 g in Vitamin-Vormischungen nachweisen.

2.1.2.2. Zinndichlorid als Reagens:

Angeregt durch BRÜGGEMANN et al. (1952, 1953, 1954) haben TSCHAPPE und PLESSING (1955) mehrere Metallhalogenide (SnCl₂, HgCl₂, PbCl₂, BiCl₃) auf ihre Verwendbarkeit zur chemischen Vitamin D-Bestimmung geprüft und im Zinndichlorid ein brauchbares Reagens gefunden. SnCl₂, in Acetylchlorid gelöst, läßt in reinen Lösungen (CHCl₃) von Vitamin D₂ und Vitamin D₃ eine gelbe, bei bestrahlten Präparaten eine rötliche Färbung, die jedoch die Meßergebnisse nicht beeinträchtigt, entstehen. Vitamin A reagiert unter Blaufärbung und muß vorher chromatographisch abgetrennt werden. Cholesterin, 7-Dehydrocholesterin und Ergosterin stören kaum, weshalb eine vorherige Ausfällung mit Digitonin in der Regel nicht notwendig ist.

Mit dieser Methode wird eine gute Übereinstimmung mit biologischen Testergebnissen erreicht. Der Wegfall der Digitoninfällung zur Entfernung störender Sterine bedeutet eine erhebliche Einsparung an Zeit, Material und Kosten und erhöht gleichzeitig die Genauigkeit der Bestimmung.

2.1.3. Chromatographische Verfahren

2.1.3.1. Papierchromatographie:

In Anlehnung an eine frühere Methode von KODICEK und ASHBY (1954) ziehen LEEMANN und STICH (1962) zur Vitamin D-Bestimmung die Beobachtung heran, daß der Rf-Wert (Verhältnis der Strecken Startpunkt bis Substanzfleck : Startpunkt bis Lösungsmittelfront) von Vitamin D₂ auf Papier mit apolaren Lösungsmitteln als mobile Phase (z.B. Petroläther), von der Menge des aufgetragenen Vitamins abhängig ist. Diese Erscheinung ist auf einen stark konzentrationsabhängigen Verteilungskoeffizienten von Vitamin D₂ zwischen der mobilen apolaren Phase und dem im Papier enthaltenen Wasser als stationäre Phase zurückzuführen.

Die Meßergebnisse sind stark abhängig von der Temperatur, von der Konzentration der für die Analyse aufgetragenen Lösung und somit von der Fleckengröße, weshalb stets ein konstantes Volumen aufgetragen werden muß. Als stationäre Phase zur Imprägnierung des Papiers dient 90% iges Aceton und als mobile Phase mit Petroläther gesättigtes Wasser. Die Flecke werden entweder durch Fotografieren im UV-Licht oder mit Phosphorwolframsäure sichtbar gemacht. Die Auswertung der Chromatogramme kann nicht über den Rf-Wert erfolgen, da die Front der mobilen Phase praktisch nicht sichtbar ist. Die Autoren haben dafür eine andere Verhältniszahl gebildet, den Flux-Faktor (Ff), der folgendermaßen zustande kommt: Zwei Vergleichslösungen mit Vitamin D₂, deren Konzentrationen sich der Einfachheit halber wie 1:2 verhalten, werden hergestellt, von denen je 5 µcl aufgetragen und gleichzeitig mit der zu bestimmenden unbekannten Vitaminlösung chromatographiert.

Nach dem Chromatogramm wird die Laufstrecke (mm) der kleineren Konzentration als Basislinie gleich Eins gesetzt, während die Laufstrecke (mm) der höheren Konzentration dividiert durch die Laufstrecke der kleineren eine Zahl >1 , eben den Flux-Faktor (Ff) ergibt.

Mit der Laufstrecke der unbekannten Lösung wird gleich verfahren. Wenn die gemessenen Ff-Werte in ein Koordinatensystem eingetragen werden, dessen logarithmische Abszisse den Substanzmengen in mcg/5mcl und dessen lineare Ordinate den Verhältnissen der Laufristanzen entsprechen, so kann der Wert der unbekannten Lösung direkt in mcg/5mcl abgelesen werden.

Durchführung: Ein erstes, orientierendes Chromatogramm gibt einen ungefähren Vitamin D-Gehalt der Probe. Für eine genaue Bestimmung, wird die Testlösung im Verhältnis 1:10 verdünnt ($x/10$) und erneut wie oben chromatographiert. (Bei Angaben über den mutmaßlichen Vitamin D-Gehalt, entfällt das erste, orientierende Chromatogramm).

Bei der Durchführung von 50 Papierchromatogrammen ergab sich eine Streuung der Meßresultate von $\pm 3\%$. Der Arbeitsaufwand pro Analyse, ausschließlich Herstellung der Lösungen, beträgt bis zur fertigen Auswertung $1\frac{1}{2}$ Stunden. Das Verfahren bewährt sich zur Bestimmung von reinem Vitamin D, z.B. in folgenden Präparaten (33):

1. wässrige Lösungen,
2. trockene Applikationsformen wie Tabletten, Dragées, Trockenampullen,
3. ölige und fette Formen.

Bei tierischen Organen und Blutserum wurde diese Methode nicht angewendet.

Für das Verfahren Papierchromatographie gibt GSTIRNER (1965) die Vitaminverluste mit 10-20% an.

2.1.3.2. Gaschromatographie:

Nachdem die Gaschromatographie in der Analyse der Fettsäuren bereits große Bedeutung erlangt hatte, beschrieben MURRAY et al. (1966) eine Methode zum Nachweis kleiner Vitamin D-Mengen mit Hilfe von Dünnschicht- und Gaschromatographie. Die Autoren gingen davon aus, daß Vitamin D_2 und Vitamin D_3 beim Erhitzen auf 180-200 °C in je zwei isomere Verbindungen, Pyrocalciferol (Pyrovitamin) und Isopyrocalciferol (Isopyrovitamin) übergehen (72,73).

NAIR et al. (1965) zeigten, daß sich diese Derivate in konstantem Verhältnis bilden, und daß sie durch Gaschromatographie voneinander getrennt werden können.

MURRAY et al. (1966) erreichten eine Isomerisierung durch Behandlung mit SbCl_3 zu Isocalciferol, das bei der Gaschromatographie nur einen Peak gibt, während das unbehandelte Vitamin zwei getrennte Peaks gibt.

Da die Isovitarine D_2 und D_3 sich während der ganzen Analyse gleichverhalten, mit Ausnahme in der Gaschromatographie, kann jeweils eines als "innerer Standard" für das andere dienen. Der "innere Standard" ermöglicht die Abschätzung der Vitamin D-Verluste im Verlauf der Probenverarbeitung und erhöht damit die Analysengenauigkeit (74).

Durchführung: Entsprechend dem erwarteten Vitamin D-Gehalt der Probe wird eine korrespondierende Menge Vitamin D-Standard der Probe zugefügt. Nach 30-minütiger Verseifung mit Äthanol und Kalilauge und Extraktion mit Diäthyläther wird der unverseifbare Rückstand in Methanol gelöst, die Sterine werden mit Digitonin ausgefällt. Nach Überführung von Vitamin A in Anhydrovitamin A mit Hilfe von Leichtpetroleum, Stickstoff und äthanolischer Salzsäure, erfolgt zunächst in einer ersten Dünnschichtchromatographie die Entfernung von Vitamin A als Anhydrovitamin A. In einer zweiten Dünnschichtchromatographie wird dann der Rest des Cholesterins nach Behandlung mit Antimontrichlorid abgetrennt. Der Rf-Wert von Cholesterin (0,28) wird durch die Behandlung mit SbCl_3 nicht verändert, dagegen wächst der Rf-Wert von Vitamin D von 0,36 auf 0,47 für das Vitamin D- SbCl_3 -Produkt an. Dieses Produkt wird anschließend von der Platte abgeschieden, in Leichtpetroleum gelöst und mit Hilfe der Gaschromatographie näher bestimmt. Die Ergocalciferol- und Cholecalciferol- SbCl_3 -Produkte lassen sich als voneinander getrennte Peaks. Unter Verwendung der Peak-Flächen wird das unbekannte Vitamin durch einfachen Vergleich mit dem "inneren Standard" bestimmt.

Die Methode wurde angewandt zur Bestimmung des Vitamin D-Gehaltes in Rattenleber, Niere und Serum, dagegen nicht in den Faeces, da hier interferierende Substanzen nicht entfernt werden konnten, wenn Ratten 250 mcg Vitamin D erhalten hatten. Es ist damit möglich, weniger als 3 mcg des Vitamins in der Leber nachzuweisen.

Die Methode ermöglicht zudem eine Differenzierung von Ergocalciferol und Cholecalciferol in der Testprobe.

2.1.3.3. Gas-Flüssigchromatographie:

JANECKE und BRENDEL (1971) zogen die Gas-Flüssigchromatographie zur Bestimmung des Vitamin D-Gehaltes der Milch heran. In Untersuchungsreihen mit Milch, deren Vitamin D-Gehalt zuvor durch UV-Bestrahlung auf Gehalte bis zu 1000 I.E. pro Liter angereichert worden war, ließ sich Vitamin D bestimmen. Das Verfahren der weitgehenden Isolierung des Wirkstoffes aus dem Fett- und Rohproteinanteil der Milch lehnt sich an die bisher übliche Analytik an (Abtrennung, Verseifung, Fällung des Sterinanteils, Verteilungs-Flüssigchromatographie).

Die gereinigte unverseifbare Fraktion wird nach Silylierung mit Bis-trimethylsilyl-acetamid (BSA) in eine mit 5% Butandiolsuccinat-Polyester imprägnierte Gas-Chrom-Q-Säule (180 x 0,4 cm) injiziert. Der Pyrocalciferol-Silyläther-Peak gilt als Meßgrundlage. Durch ein geeignetes Standardzusatzreagens (β -Cholestanol und Vitamin D₃) im BSA läßt sich das Chromatogramm für eine quantitative Messung verwenden. Man schneidet die Peakflächen gemäß der eingezeichneten Basislinie aus und wiegt die Peakflächen (4-5 Messungen pro Probenansatz; Standardabweichung 5-6%).

Inzwischen ist die Gas-Flüssigchromatographie von verschiedenen Autoren zur Bestimmung des Vitamin D-Gehaltes in fettfreier Trockenmilch, pharmazeutischen Präparaten, Multivitamin-Tabletten, Rohmaterialien und im Blutserum des Menschen herangezogen worden (53,48,28,2). In den genannten Anwendungsgebieten erfolgt die stufenweise Isolierung des Vitamin D von den begleitenden Stoffen auf unterschiedliche Weise (Verseifung, Fällung des Sterinanteils, Verteilungschromatographie, Isomerisierung).

2.2. Biologische Methoden der Vitamin D-Bestimmung:

2.2.1. Grundlagen

Wie die Frühgeschichte von Vitamin D ("antirachitischer Faktor") belegt, beruhten sowohl grundlegende Entdeckungen und damit die gesamten frühen Kenntnisse über Vitamine, als auch die ursprünglichen Vitaminbestimmungsmethoden auf den Ergebnissen des biologischen Testes. Im Laufe der Zeit wurden die biologischen Nachweismethoden verfeinert; dabei ergab sich ein Übergang vom qualitativen zum quantitativen Maßstab.

Unter biologischen Methoden der Vitaminbestimmung versteht man im weiteren Sinne sämtliche Verfahren, die von der Reaktion lebender Organismen auf Vitamin D-Gaben ausgehen. Als grundlegendes Prinzip der biologischen Vitaminbestimmung gilt der Vergleich der Wirksamkeit von untersuchtem Material und Standardpräparat. Die Genauigkeit des Wirkungsvergleichs hängt von der Definition und Erfäßbarkeit des Vitamin-spezifischen Effektes am Erfolgsorgan ab. Als geeignete Indikatoren der Vitamin D-Versorgung gelten der Tibia-Aschengehalt oder die Intensität der rachitischen Knochenveränderungen.

Grundlage sämtlicher biologischer Bestimmungsmethoden der antirachitischen Wirksamkeit eines Präparates ist bisher die quantitative Feststellung der Knochencalcifizierung bei Ratten oder Küken im Vergleich zu Kontrolltieren, deren Skelett experimentell hervorgerufene rachitische Veränderungen aufweist. Durch Verwendung der beiden genannten Tierarten ist es auch möglich, Ergocalciferol spezifisch von Cholecalciferol zu unterscheiden. Die Rachitis der Ratten wird durch annähernd gleiche Dosen dieser beiden Vitamine geheilt. Beim Vogel hingegen ist nur Vitamin D₃ voll wirksam, Vitamin D₂ erreicht bei Anwendung gewichtsgleicher Mengen nur ca. 3-4% der Vitamin D₃-Wirksamkeit (56).

Voraussetzung aller Bestimmungsverfahren ist, daß am Versuchstier eine kontrollierbar verlaufende Mangelkrankheit experimentell erzeugt werden kann, die dem Bild der Rachitis entspricht, und die durch Gaben von Vitamin D geheilt werden kann.

So hängt auch die Zuverlässigkeit der biologischen Vitaminbestimmung von einer Reihe von Faktoren ab, die nur unvollkommen kontrolliert werden können. Hierzu zählen: Das Versuchstier, die Basalration und die Testprobe. Um den Verlauf der Knochencalcifizierung verfolgen zu können, sind verschiedene Verfahren entwickelt worden.

Nach der Art der Ausführung werden die biologischen Methoden in 2 Grundtypen eingeteilt: Bei der kurativen Durchführung wird die kleinste Menge der untersuchten Probe bestimmt, welche die zuvor experimentell hervorgerufene Avitaminose gerade noch zu heilen vermag. Bei der prophylaktischen (präventiven) Versuchsanstellung wird die geringste Dosis bestimmt, welche die Ausprägung einer Avitaminose noch verhütet. Zur Gruppe der kurativen Verfahren zählen die Röntgenmethode, der Line-Test und die relativ junge ^{32}P -Methode. Unter den prophylaktischen Methoden finden vorwiegend der Knochenaschen-test und eine modifizierte Röntgenmethode weit verbreitet Anwendung.

Die Vorteile der prophylaktischen Verfahren liegen in einer erheblichen Verkürzung der Versuchsdauer durch Wegfall der Depletionsperiode, d.h. der rachitogenen Vorbereitung. Als Nachteil ergibt sich, daß die Ausgangslage der Versuchstiere bei Versuchsbeginn nicht qualitativ und quantitativ erfaßt werden kann. Auch sind eventuelle Vitaminreserven nicht zu erkennen. Als Möglichkeit zur Verbesserung der Aussagefähigkeit bietet sich die Untersuchung unbehandelter Kontrolltiere an, die aber auch bei Verwendung von Tieren desselben Wurfs bzw. Schlupfs keinen unter allen Umständen zuverlässigen Vergleich erlauben.

Dieser Nachteil wird beim kurativen Verfahren durch Einschalten einer Depletionsperiode umgangen. Die Tiere befinden sich bei Versuchsbeginn in einer relativ einheitlichen und kontrollierbaren (Röntgen) Ausgangsrachitis, was aber gleichzeitig eine Verlängerung der Versuchsdauer zur Folge hat.

Die zur Durchführung des kurativen Tests notwendige rachitische Ausgangslage als Vitamin D-Mangelsymptom ist bei der Ratte schwieriger auszulösen als deutliche Mangellagen anderer Vitamine, zu deren Sichtbarmachung und Ausprägung in der Regel der Wegfall des entsprechenden Vitamins in der Nahrung genügt. Zur Erzeugung der Ausgangsrachitis muß außer einem Vitamin D-Mangel noch eine Veränderung in der Mineralzusammensetzung, insbesondere des Ca:P-Verhältnisses der Diät eintreten, bevor die Ration rachitogene Eigenschaften erhält. Die gebräuchlichsten Kostformen gehen auf die von McCOLLUM (1922) vorgeschlagene Diät^x zurück, die Ca und P im Mindestverhältnis von 4:1 enthält. Nur mit Rationen, die bei weitestgehendem Freisein von Vitamin D ähnliche Ca:P-Verhältnisse aufweisen, läßt sich ein ausgeprägtes Bild der Rachitis bei wachsenden Ratten in ausreichender Fallzahl erzeugen.

Im Folgenden sollen die einzelnen gebräuchlichen Verfahren näher beschrieben und erörtert werden.

2.2.1.1. Line-Test (43)

Bei Durchführung des Line-Testes als kurativem Test, werden die durch Heilbehandlung neugebildeten Kalkzonen im Knochen sichtbar gemacht, meist indem Radius und Ulna der Ratte Extremitäten an ihren distalen Enden gespalten, mit Silbernitrat behandelt und belichtet werden. Die Ausdehnung und Intensität der nun schwarzen Kalkbänder (durch photochemische Reduktion von Silberphosphat zu kolloidalem Silber) gilt als Maß der unter Vitamin D-Einfluß abgelaufenen Rachitisheilung (Knochencalcifizierung) und ist jeweils mit der Vitamin D-Gabe eng positiv korreliert. Die Kalkbänder d.h. Ausmaß und Intensität der schwarz gewordenen Zone werden mit einer Auswerteskala verglichen, die mit Hilfe von Standardpräparaten erstellt wurde.

^xDiät nach McCOLLUM (1922) Nr. 3143

Gelber Mais	33
Weizenschrot	33
Weizenkleber	15
Gelatine	15
CaCO ₃	3
NaCl	1

Der subjektive Fehler bei Ablesung und Einordnung in eine Meßskala kann bei hinreichender Erfahrung gemildert werden. Bei Auswertung durch dieselbe Person zu verschiedenen Zeiten beträgt der Ablesefehler noch 5%. Insgesamt liegt damit die Fehlergrenze des Line-Tests unter Verwendung von 20 Ratten/Dosis bei $\pm 10\%$, bei 10 Tieren bei $\pm 17\%$ (9).

Als Nachteil der Line-Testmethoden muß neben dem relativ hohen Zeitaufwand die große Versuchstierzahl angesehen werden, die erforderlich ist, um die individuellen Schwankungen der Versuchstiere auszugleichen. Ferner kann der Ausgangspunkt der veränderten Knochencalcifizierung nicht am gleichen Tier ermittelt werden, sondern muß über Kontrolltiere, die bei Versuchsbeginn ausgewertet wurden, abgeschätzt werden. Die Auswertung kann nur am toten Tier vorgenommen werden.

2.2.1.2. Knochenaschentest (39)

Der prophylaktische Knochenaschentest benützt eine Beziehung zwischen dem Mineralgehalt der Knochen und der Vitamin D-Zufuhr in der Nahrung bei Ratten, die mit einer der bekannten rachitogenen Diäten ernährt wurden. Der prozentuale Anteil der Asche in der Trockensubstanz des entfetteten Knochens (Humerus und Femur; oder Tibia, Fibula und Femur) ist negativ korreliert mit der Stärke der aufgetretenen Rachitis, woraus an Hand von Standardkontrollen Rückschlüsse auf die verabreichte Vitamin D-Menge gezogen werden. Negative Kontrollen (rachitische Tiere) weisen dabei etwa 30%, positive Kontrollen (gesunde Tiere) etwa 52% Knochenasche auf.

Der Knochenaschentest gilt als der objektivste Test überhaupt, da Trockensubstanz- und Aschebestimmungen im Knochen zu leicht objektivierbaren und jederzeit nachprüfbaren Werten führen, ohne daß für die auswertende Person eine spezielle Einarbeitung und Übung in der Beurteilung erforderlich ist. Da die Tiere bei diesem Verfahren ebenso wie beim Line-Test nur einmalig, eben nach der Tötung, in ihrem Rachitisgrad beurteilt werden können, können Tiere, die vom Durchschnittsergebnis erheblich abweichen, nur durch eine entsprechend große Versuchstierzahl eliminiert werden, was bei diesem relativ umständlichen Auswerteverfahren eine wesentliche Mehrarbeit bedeutet.

Es ist bei diesem Verfahren nicht möglich, den genauen Grad der Rachitis zu Versuchsbeginn bei den einzelnen Tieren nachzuweisen; er kann nur durch möglichst gleichartige Kontrolltiere jeweils abgeschätzt werden. Auch Tiere aus dem gleichen Wurf bei annähernd gleichem Gewicht weichen oft merklich in ihrem Rachitisgrad voneinander ab.

2.2.1.3. Cholecalciferolnachweis mit Küken (43,29)

Bezogen auf Gewichtseinheiten sind Ergo- und Cholecalciferol bei Ratten nahezu gleichwertig antirachitisch wirksam, nicht dagegen bei Küken. Hier ist Cholecalciferol dem Vitamin D_2 etwa um den Faktor 25 überlegen. Daher kann die simultane Verabreichung einer Probe an Ratten und Küken Aufschluß über das Vorliegen von Ergo- oder Cholecalciferol im untersuchten Material geben (20,26,38).

In der Vergangenheit sind die an Ratten üblichen Methoden von den verschiedensten Untersuchern mit Erfolg auch bei Küken angewandt worden. Von den früher vereinzelt durchgeführten Wachstumstesten ist man heute wegen ihrer geringen Spezifität und Empfindlichkeit ganz abgegangen (45). Zwei Methoden jedoch haben die Behörden der Vereinigten Staaten (USA) und Englands offiziell empfohlen: Die Knochenasche- und Röntgenmethode. Die Röntgenmethode an Küken entspricht in ihrem Grundsatz und der Durchführung den Versuchen mit Ratten.

Die prophylaktische Knochenaschemethode ist die offizielle Methode der A.O.A.C. ("Official and Tentative Methods of Analysis") und der B.S.I. ("British Standard Method for the Biological Assay of Vitamin D_3 by the Chick Method"). Sie beruht auf der Beobachtung, daß die Tibiaasche, ausgedrückt in Prozent der fettfreien Knochentrockensubstanz, der Küken in einem Koordinatensystem gegen den Logarithmus der Vitamin D-Menge in der Ration aufgetragen, eine Gerade ergibt. Die Versuchsauswertung geschieht graphisch.

Seit kurzem bevorzugen verschiedene Laboratorien die prozentuale Zehenaschemethode. Nach einer 21-tägigen Versuchsperiode wird die 3. Zehe der Küken im Grundgelenk abgetrennt. Sämtliche Zehen einer Gruppe werden zusammen zerkleinert und nach Extraktion mit 95%-igem Äthanol wird die Knochenasche bestimmt. Die Auswertung der ermittelten Aschegehalte erfolgt analog zum obigen Verfahren.

Während im Tibia-Aschetest die Versuchszeit 3-6 Wochen dauert, wobei mit zunehmender Testdauer die Meßgenauigkeit steigt, beträgt die Versuchsperiode für die Zehenasche-Methode nur noch 3 Wochen. Als besonderer Vorteil dieser Methode muß neben Zeitersparnis und Vereinfachung der Knochenaschebestimmung, die Tatsache angesehen werden, daß die Versuchstiere bei diesem Verfahren nicht getötet werden müssen und somit weiterhin für andere Versuchszwecke verwendet werden können.

2.2.1.4. Röntgenmethode (6,39,11)

Die Röntgenmethoden erlauben eine ständige individuelle Prüfung der Versuchstiere vor und während des Versuches. Durch diese Überprüfung der rachitogenen Veränderungen am Einzeltier ist es leicht möglich, alle außerhalb einer gewissen Spannweite variierenden Tiere zu eliminieren. So können auch bei Auswertung einer geringen Anzahl von Tieren, noch genaue Ergebnisse erzielt werden. Als Rachitissymptom, das röntgenographisch graduell erfaßt wird und in Beziehung zur Vitamin D-Aktivität einer Untersuchungssubstanz gebracht wird, dient die Störung der enchondralen Ossifikation, wie sie bei Ratten besonders deutlich im Epiphysenfugenknorpel des proximalen Tibiaabschnittes nachzuweisen ist.

Es wurde mit Erfolg versucht, die Verkalkungsverhältnisse in der Metaphyse nach Maß und Zahl auszudrücken und damit die Auswertung der Röntgenbilder vom subjektiven Fehler des Betrachters weitgehend zu befreien.

Durchführung (Kurativer Test): Junge Ratten erhalten als rachitogene Post die Grunddiät nach McCOLLUM Nr. 3143 (s.S.17). Nach 14 Tagen Vorbereitungsperiode wird jedes Versuchstier erstmals geröntgt, d.h. am Beginn des kurativen Testverfahrens zur Ermittlung der Ausgangsrachitis.

Vor der Applikation des Untersuchungsmaterials ist in der Regel eine Aufarbeitung der Probe notwendig. Dazu wird die Untersuchungsprobe nach Verseifung der Rohfettanteile, mit Äther oder Petroläther extrahiert. Der nach Verdampfen des Extraktionsmittels resultierende Rückstand wird in Olivenöl (DAB 7) aufgenommen, um Vitamin D-Konzentrationen von 0,2-2 I.E./o,1 ml zu erreichen. Die erhaltenen Testlösungen werden ebenso wie die Standarddosierungen den Ratten täglich einpipettiert. Nach einer 7-tägigen evtl. auch 14-tägigen kurativen Versuchszeit werden weitere Röntgenbilder angefertigt.

Die Auswertung der Röntgenbilder erfolgt in der Weise, daß die Spalthöhe des proximalen Tibiaendes, die durch die mangelnde Verkalkung in der Längenwachstumszone dargestellt wird, im 16-fach vergrößerten Röntgenbild nach Millimeter ausgemessen, und die Werte dieser "Rachitisstärke" vor und nach der Heilbehandlung miteinander verglichen werden. Die mittlere Spalthöhe ergibt sich nach BLUNK (1951) durch den Quotienten: "Fläche der unverkalkten Zone am proximalen Tibiaende/Tibia-durchmesser am proximalen Rand der Diaphysenverkalkung". Es hat sich auch als zweckmäßig erwiesen, vor der "objektiven" mechanischen Auswertung die einzelnen Aufnahmen "subjektiv", d.h. visuell auf ihre Brauchbarkeit zu beurteilen.

Der Meßbereich für die biologische Vitamin D-Bestimmung liegt etwa in einer Größenordnung von 0,2-2 I.E./o,1 ml Olivenöl. In neuerer Zeit wird der Röntgentest zur Verkürzung der Versuchsdauer auch in der prophylaktischen Modifikation durchgeführt (1,4). Das Verfahren beruht ebenso wie die kurative Röntgenmethode auf der visuellen Abschätzung des Rachitisgrades im Röntgenbild und Vergleich der Ossifikation nach Gaben des Standardpräparates und der zu untersuchenden Probe.

Die Röntgenmethode und der Line-Test beinhalten noch immer eine Reihe von Fehlermöglichkeiten infolge des doch mehr oder weniger subjektiven Auswerteverfahrens. Sie bieten aber im Gegensatz zu den Knochenaschemethoden den hoch einzuschätzenden Vorteil, daß die präparierten Knochen bzw. Röntgenbilder aufbewahrt, und die Auswertungen in zeitlichen Abständen oder auch durch verschiedene Personen nachgeprüft werden können. Während für die Durchführung des Röntgentestes eine relativ aufwendige Röntgenvorrichtung benötigt wird, kommt der Line-Test ohne spezielle Apparaturen und Materialien aus. Beiden Verfahren gemeinsam ist die vorherige Aufbereitung der Probe.

2.2.1.5. ^{32}P -Methode

Die bisher geschilderten biologischen Verfahren zur Vitamin D-Bestimmung benutzten unterschiedliche Kriterien der Knochencalcifizierung; z.B. Ausmaß und Intensität der durch Silbernitrat sichtbar gemachten Kalkstreifen (Line-Test), den prozentualen Anteil der Asche in der Trockensubstanz des entfetteten Knochens (Knochenaschemethoden) oder die Ausdehnung der optisch erfaßbaren Verknöcherungszone (Röntgentest). 1951 beschrieben SNYDER et al. eine neue Methode, Vitamin D in kleinen Mengen nachzuweisen, bei der die Aktivität des Phosphorisotops (^{32}P), das im Verlauf der Mineralisierung in das Skelett eingelagert wurde, gemessen wird und in Beziehung zur verabreichten Vitamin D-Konzentration gesetzt wird.

Durchführung: 50-60 g schwere, 21 Tage alte Sprague-Dawley Ratten werden auf die rachitogene Kost Nr. 2965^x (STEENBOCK und BLACK, 1925) gesetzt. Nach 16 Tagen wird eine einmalige Vitamin D₂-Dosis mit der Sonde peroral verabreicht. Die Dosierungen des Vitamin D-Standardpräparates liegen dabei im Bereich zwischen 0,5 und 50 I.E. pro Ratte, die vorher in 0,04-0,25 ml Baumwollsaamenöl aufgenommen worden waren. Zur Aufstellung der Standardgeraden genügen nach Ansicht der Autoren die Vitamin D-Dosierungen 0,5 und 50 I.E.; als Dosis des Testpräparates werden 5 I.E. in 0,1 ml Baumwollsaamenöl vorgeschlagen. 48 Stunden nach Verabreichung des Vitamins, werden 0,25 ml einer isotonischen Kochsalzlösung, die annähernd 20 mc Ci ^{32}P (≤ 10 mcg ^{31}P) enthält, intraperitoneal injiziert. Nach der Injektion werden die Ratten weitere 10 Tage auf Ration Nr. 2965 gehalten. Am Ende der 10-Tage-Periode wird die äußere Meßrate ("external counts") an der rechten Vorderpfote des anästhesierten Tieres mit Hilfe eines Geiger-Müller-Zählers gemessen.

Zwischen der "äußeren Meßrate" (Anzahl der Impulse in 100 sec.) und dem Logarithmus der Vitamin D₂-Dosis besteht im geprüften Bereich (0,5-50 I.E.) eine lineare Beziehung. Der durchschnittliche Meßbetrag von 10 Ratten, der mit der unbekannten Vitamin D-Konzentration erreicht wird, wird mit den Werten einer Standardkurve von bekanntem Vitamin D-Gehalt verglichen.

Diät nach STEENBOCK und BLACK (1925) Nr. 2965

Gelber Mais	76
Weizenkleber	20
CaCO ₃	3
NaCl ⁷	1

Nach Angaben der Autoren können mit dieser Methode auch noch weniger als 0,5 I.E. und mehr als 50,0 I.E. in der oral verabreichten Dosis Vitamin D quantitativ ermittelt werden. (Die korrespondierende Spannweite im Line-Test beträgt nur 2-8 I.E.). Abhängig von der Dosishöhe wird für das ^{32}P -Verfahren ein Konfidenzbereich von $\pm 35-50\%$ angegeben.

Zu den Vorteilen dieser Methode zählen der geringere Arbeitsaufwand (2-3 Minuten pro Ratte) im Vergleich zum Line-Test. Weiter kann herausgestellt werden, daß die Versuchstiere nicht getötet werden müssen und deshalb später noch für andere Untersuchungen herangezogen werden können. Ein Nachteil ergibt sich möglicherweise aus der Anschaffung eines Geiger-Müller-Zählrohres. Die dauernde Bereithaltung bzw. der Umgang mit Radiophosphor erfordern zusätzlich spezielle Einrichtungen (Isotopenlabor) sowie besondere Maßnahmen für die Einhaltung der Sicherheitsbestimmungen.

Durch die ausgedehnte Lokalisation der Radioaktivität in den Knochen und mit einem größeren Grad an Variabilität in den Weichteilgeweben wird die äußere Meßrate nachteilig beeinflusst. Deshalb wäre eine Messung der Radioaktivität an den von Weichteilen befreiten Knochen einer solchen Bestimmung am lebenden Tier überlegen.

BLISS und GYÖRGY (1951) führten ausgedehnte, vergleichende Untersuchungen der aufgeführten biologischen Vitamin D-Bestimmungsverfahren durch und gelangten zu der Ansicht, daß die genaueste Methode die Bestimmung der antirachitischen Wirkung der Calciferole aufgrund des Aschegehaltes des entfetteten Knochens darstellt. Die Genauigkeit der Methode wird jedoch durch eine verhältnismäßig lange Versuchsdauer und einen hohen Zeitaufwand für die Knochenanalyse (Befreiung des Knochens vom umgebenden Weichteil- und Fettgewebe) erkauft. Der Line-Test und die röntgenographische Methode sind weniger genau, da nach beiden Verfahren das Stadium der Rachitisheilung in vielen Fällen lediglich subjektiv ausgewertet werden kann. Falls daher der Untersucher nicht über genügend Erfahrung verfügt, wird das Ergebnis mit einem beträchtlichen Fehler behaftet sein. Aus diesem Grund wird empfohlen, die Bilder von mehreren Untersuchern auswerten zu lassen und die Ergebnisse dann zu mitteln.

Aus Untersuchungen von O'BRIEN und MORGAREIDGE (1939) ist bekannt, daß bei optischer Auswertung der Knochencalcifikation im Röntgentest der Phosphor-Gehalt der Grunddiät die Ergebnisse besonders augenfällig zu verfälschen in der Lage ist. So wurde durch zusätzliche Gaben von 4 mg Phosphor/ Tier und Tag für die Testdosis Vitamin D eine 3,4 fach höhere antirachitische Wirkung ermittelt als in der Gruppe ohne zusätzliche P-Zufuhr. Nur bei nährstoffmäßig gleicher Basaldiät können vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.

IOPUCHOVSKY (1967) kommt zu dem Schluß, daß Röntgentest und Knochenaschetest am Küken kombiniert zu den besten Ergebnissen führen.

Ein endgültiges Urteil über die Brauchbarkeit der einen oder anderen biologischen Vitamin D-Bestimmungsmethode ist schwierig zu fällen. Bei Heranziehung eines genügend großen Tiermaterials und bei ausreichend Erfahrung in Testversuchen scheinen sie gleichwertig zu sein.

2.3. Vergleichende Betrachtung

GASSMANN (1958) und GEBAUER (1958) haben sich in einer ausführlichen Publikation mit den Vor- und Nachteilen biologischer und physikalisch-chemischer Vitamin D-Nachweisverfahren auseinandergesetzt. Bei dieser Art der vergleichenden Betrachtung sind die Vorzüge der einen Methode in der Regel mit den Nachteilen der anderen Verfahren gleichzusetzen.

So wurden als Vorzüge der physikalisch-chemischen Methoden (=Nachteile der biologischen Verfahren) herausgestellt:

1. Physikalisch-chemische Methoden sind in wenigen Stunden durchführbar, während biologische Vitamin D-Teste mehrere Wochen dauern. Physikalisch-chemische Vitamin D-Analysen sind daher im allgemeinen für Serienbestimmungen geeigneter.

2. Bei Anwendung physikalisch-chemischer Methoden sind die Kosten (Chemikalien) im Vergleich zu biologischen Nachweisverfahren weitaus geringer. Biologische Methoden sind durch die Notwendigkeit der Züchtung von Versuchstieren, die gegenüber Rachitis besonders empfindlich sind, und die längere Versuchsdauer wesentlich kostspieliger. Chromatographische Nachweisverfahren stellen oft komplizierte Verfahren der Spurenanalyse dar, die nicht allgemein für Serienbestimmungen anwendbar sind, sondern je nach Material modifiziert werden müssen.
3. Durch die geringere Streuung der analytisch ermittelten Ergebnisse ist die Reproduzierbarkeit besser als bei biologischen Verfahren. Die starke Streuung der Ergebnisse biologischer Methoden ist zum einen durch eine innerhalb kürzester Zeit schwankende Reaktionsfähigkeit der Tiere und zum anderen durch die Schwierigkeit, den Grad der Knochen calcifizierung richtig auszuwerten, bedingt. Sie kann nur durch eine hinreichend große Anzahl von Versuchstieren gemindert werden. Die Erhöhung der Tierzahl bedeutet aber zugleich einen weiteren Anstieg der Versuchskosten.
4. Bei längerer Lagerung einer Probe können sich partiell aus Vitamin D biologisch relativ wirkungslose Metaboliten bilden. Dieser Vorgang wird im biologischen Verfahren nur als Konzentrationsabnahme erfaßt. Mit geeigneten physikalisch-chemischen Methoden können die Metaboliten dagegen direkt ausgewiesen werden.
5. Die Methoden sind darüberhinaus für die chemische und physikalische Charakterisierung von Vitamin D-Standards brauchbar.

Als Vorzüge der biologischen Vitamin D-Bestimmungsverfahren (= Nachteile der physikalisch-chemischen Methoden) wurden aufgeführt:

1. Die antirachitische Wirkung von Naturprodukten muß als Folge mehrerer synergistisch oder auch antagonistisch wirkender Substanzen verstanden werden. Die physiologische Wirkung einer Probe kann daher nur im biologischen Test zuverlässig erfaßt werden.

In den meisten Fällen der Untersuchung einer Probe (Futtermittel, Lebensmittel) interessiert letztlich nur die Summe aller antirachitisch wirkenden Faktoren, die durch physikalisch-chemische Analysen nicht exakt bestimmt werden kann.

2. Durch Verwendung von Ratten und Mäusen im biologischen Test ist es möglich, Ergocalciferol spezifisch von Cholecalciferol zu unterscheiden. Dagegen boten die physikalisch-chemischen Methoden bisher keine Möglichkeit zwischen Vitamin D₂ und Vitamin D₃ zu differenzieren. Erst mit Hilfe der neueren chromatographischen Verfahren (Gaschromatographie) konnte Ergocalciferol von Cholecalciferol getrennt werden.
3. Die Empfindlichkeit (Nachweisgrenze) der biologischen Vitamin D-Bestimmungsverfahren wurde trotz fortwährender Verbesserung der chemisch-physikalischen bzw. chromatographischen Methoden noch nicht erreicht.

Es sei noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen, daß aus biologischen Bestimmungsverfahren ermittelte Werte nicht unbedingt mit den aus chemisch-physikalischen Methoden stammenden verglichen werden dürfen, sofern nicht reines Vitamin D vorliegt. Beide grundsätzlich verschiedenen Methoden haben unterschiedliche Aussageberechtigungen und -möglichkeiten. Der wesentlichste Unterschied dieser Methoden besteht darin, daß mit Hilfe der chemisch-physikalischen Verfahren die Konzentration des Vitamin D in einem vielfältigen Stoffgemisch, wie es im natürlichen Material vorliegt, ermittelt wird. Die biologische Vitamin D-Bestimmung erfaßt dagegen nicht nur das Vitamin D allein, sondern stellt die Ermittlung der Summe antirachitisch wirksamer Verbindungen dar, von denen neben Vitamin D, insbesondere die Praecalciferole und Tachysterin zu nennen sind. Hiervon kann letzteres vernachlässigt werden, da seine antirachitische Wirkung nur gering ist. Nach BEKEMEIER (1966) sind die beiden anderen Verbindungen (Vitamin D₃ und die Provitamine) in ihren Wirkungen "verwandt". Genauere vergleichende Untersuchungen scheinen zu fehlen. Aus diesen Gründen kann bis heute noch nicht auf die biologischen Vitamin D-Bestimmung verzichtet werden.

Die bisher gebräuchlichen biologischen Vitamin D-Test-Verfahren lehnen sich in bestimmten Verfahrensgängen sehr stark an die physikalisch-chemischen Methoden an. So ist in den meisten Fällen eine Aufbereitung des Probenmaterials (Verseifung der Rohfettanteile, Extraktion mit Äther) notwendig. Sie schließen mit physikalischen Methoden, die apparativ mindestens so aufwendig sind, wie sie für die physikalisch-chemischen Methoden erforderlich sind (z.B. Geiger-Müller-Zähler, Röntgenapparat). Es sollte daher versucht werden, ein biologisches Vitamin D-Nachweisverfahren noch weiter zu vereinfachen, ohne an Aussagegenauigkeit zu verlieren. Auf der Beziehung Vitamin D₃-Versorgung und Eischalenverkalkung bei der japanischen Wachtel sollte ein Testverfahren aufgebaut und erprobt werden.

Bei der Erarbeitung des Verfahrens sollte besonderer Wert gelegt werden auf:

1. die einfache, für Routineverfahren geeignete Erfassung der Eischalenverkalkung.
2. die Umgehung von Aufarbeitungsverlusten, die durch Probenextraktion in der Regel entstehen.
3. Der Test sollte ferner nicht an einer speziell für diesen Zweck aufgezogenen und gehaltenen Zuchtlinie durchgeführt werden.
4. Der erforderliche Zeitaufwand sollte weiter so gering wie möglich ausfallen.
5. Die Auswertung der Ergebnisse sollte über ein statistisches Verfahren mit Angabe der Fehlergrenzen erfolgen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Der Vitamin D₃-Gehalt von 14 Futterproben wurde im biologischen Bestimmungsverfahren an Vitamin D₃-depletierten Wachtelhennen untersucht. Dazu wurden insgesamt 8 Einzelversuche durchgeführt und ausgewertet.

3.1. Methodik: Vitamin D₃-depletierte Wachtelhennen erhielten über 12 bzw. 18 Tage (s. Einzelbeschreibung der Versuche I-VII) ein Legewachtelalleinfutter mit 3 suboptimalen Vitamin D₃-Konzentrationen zwischen 80 und 300 I.E./kg. Die zur Untersuchung anstehenden Proben wurden mit der Vitamin D-armen Basalration verschnitten und ad libitum angeboten. Die Einzelversuche unterscheiden sich hinsichtlich des Probengutes, der Vitamin D₃-Standardkonzentrationsreihen, der Dauer der Versuchsperioden und des Tiermaterials. Die allen Versuchen gemeinsamen Methoden sind in den folgenden Abschnitten 3.1.1.-

3.1.6. zusammengefaßt.

3.1.1. Tiermaterial: Die Wachtelhennen stammten aus der institutseigenen Koloniezucht. Es wurden insgesamt 4 verschiedene Wachtelkollektive verwendet. Die Versuche I, II und IVA wurden mit dem gleichen Kollektiv durchgeführt. Das Alter der Tiere lag zu Versuchsbeginn bei 25, 32 und 38 Wochen. In Versuch III waren die Tiere 11 Wochen alt, davon wurden die Überlebenden im Alter von 17 Wochen für Versuch IVB verwendet. Die Versuche V und VI wurden jeweils mit 11 Wochen alten Wachtelhennen durchgeführt. Die aus Versuch V überlebenden Hennen dienten im Alter von 20 Wochen als Versuchstiere für Versuch VII.

Vor Beginn der Depletionsperiode (3.1.2.) hatten alle Hennen für die Dauer von mindestens 14 Tagen eine methioninergänzte Mais-Soja-Ration mit 1000 I.E. Vitamin D₃/kg erhalten. Durch die den Bedarf um den Faktor 3 überschreitende Vitamin D₃-Zufuhr wurde die Eischalen-Calciumausscheidung der vorher unterschiedlich suboptimal Vitamin D₃-versorgten Wachtelhennen schon nach wenigen Tagen auf die Norm angehoben.

Alle Tiere wurden in der Vorbereitungszeit individuell mit Flügelmarken gekennzeichnet.

3.1.2. Depletion: Nach 14-tägiger Vorbereitungszeit, in der sich die Legeleistung auf einen Wert von ca. 80% eingestellt hatte und dünnchalige bzw. schalenlose Eier nicht mehr beobachtet wurden, konnte mit der Depletion begonnen werden. Dazu wurde den Wachtelhennen ein Alleinfutter ohne Vitamin D_3 -Zusatz (Tab.1) angeboten. Die Depletionsperiode (Vitamin D_3 -Verarmung) wurde durchgeführt, um die Vitamin D_3 -Speicher abzubauen und anschließend ein gleichmäßig depletiertes Tiermaterial zur Verfügung zu haben.

Wie HOFMANN (1971) zeigen konnte, liegt bei der Wachtelhenne, durch die schlechte Haftung von Vitamin D_3 im Gewebe bedingt, eine nur geringe Speicherkapazität für Vitamin D_3 vor. Die Zeit zwischen Vitamin D_3 -Entzug und dem ersten Auftreten von Vitamin D_3 -Mangelercheinungen (reduzierte Legeleistung, dünnchalige bzw. schalenlose Eier) ist entsprechend kurz. Sie liegt durchschnittlich bei 5-10 Tagen. Selbst Wachtelhennen, die über 12 Tage mit 8 000 I.E. Vitamin D_3 /kg Futter reichlich Vitamin D_3 versorgt wurden, waren nicht in der Lage, eine anschließende Vitamin D_3 -Depletionsperiode ohne Vitamin D_3 -Mangelercheinungen länger als 30 Tage zu überbrücken. Im allgemeinen wird es daher genügen, während einer Vitamin D_3 -Depletionsperiode von 2-3 Wochen den Verlauf der Legeleistung zu kontrollieren. Eine dann erfolgende Bestimmung des Eischalentrockengewichts/Tier und Tag läßt den Zeitpunkt zuverlässig erkennen, an dem eine für reproduzierbare Ergebnisse ausreichende Depletion erfolgt sein wird. Dies entspricht etwa einer Legeleistung unter 30% und einem Anteil schalenloser Eier an der Gesamteizahl über 70%. Eine länger dauernde Depletion verbietet sich aus anderen Gründen. So berichteten CHANG und MCGINNIS (1967), daß bei zu langer Vitamin D_3 -Verarmungsperiode mit erheblichen Tierverlusten (bis zu 90%) zu rechnen ist.

Bei Depletionsbeginn wurde den Wachtelhennen 3 Tage lang über das Trinkwasser 1 g Furazolidon/10 l gegen bakterielle Darminfektionen verabreicht. Damit sollte einem möglichen Unsicherheitsfaktor (Pasteurelleninfektion) vorgebeugt werden und die Variabilität innerhalb eines Wachtelkollektivs eingeengt werden.

Tabelle 1:

Vitamin D₃-arme Basalration (modifiziert nach ZUCKER et al., 1967)
Rationszusammensetzung (%):

Mais	48,0
Sojaextraktionsschrot (50% Rohprotein)	36,1
Rindertalg	5,0
Molkenpulver (teilentzuckert)	1,0
Calciumcarbonat (CaCO ₃)	6,0
Dicalciumphosphat (CaHPO ₄ ·x2H ₂ O)	2,5
Kochsalz (NaCl)	0,4
Vitaminvormischung x)	1,0
	100,0

x) Vitaminvormischung enthält in 10 g (auf Soja):

Vitamin A	5000 I.E.	Ca-Pantothenat	15 mg
Vitamin E	20 mg	Nikotinsäure	25 mg
Vitamin K ₃	1 mg	Mn (als Sulfat)	65 mg
Riboflavin	4 mg	Zn (als Carbonat)	52 mg
Vitamin B ₁₂	20 mcg	DL-Methionin	1800 mg

3.1.3. Haltung der Versuchstiere:

Während des Versuches wurden die Wachtelhennen in Plastikeinheiten auf schräggestelltem Drahtgitter gehalten. Durch geeignete Bodengitter wurde ein Abrollen der Eier ohne Beschmutzen und Beschädigen gewährleistet. Die Käfige waren so angeordnet, daß auf jeder Stallseite 32 Einheiten untergebracht waren. Jeweils 3 Wachtelhennen wurden in einem Käfig zusammen gehalten. Futter und Wasser konnten ad libitum aufgenommen werden. Die Temperatur des ca. 20 qm großen Raumes wurde mit einem elektrischen Heizkörper konstant auf ca. 18-20 °C gehalten. Die Tiere erhielten in dem abgedunkelten Stall 24-Stunden-Dauerlicht mit Hilfe von 2 Lichterketten mit jeweils 8 Birnen zu 60 Watt. Der Stall stand unter Zwangsbelüftung (Unterdruck).

Die Versuchstiere wurden in wöchentlichen Abständen gruppenweise gewogen (Versuche I-III), in 6-tägigen Intervallen wurde der Futterverzehr/Käfig (3 Tiere) gemessen (außer Versuch IVA). Als Auswertungskriterien dienten das Eischalentrockengewicht/Tier und Tag, die Gewichtsentwicklung, der Futterverzehr sowie die Mortalitätsrate.

3.1.4. Herstellung der Rationen:

In den einzelnen Versuchen wurden als Bezugsbasis für die Testpräparate 3 unterschiedliche suboptimale Standarddosen mitgeführt. Bei Herstellung der Standardkonzentrationen wurde davon ausgegangen, daß im Bereich zwischen 80 und 300 I.E. Vitamin D_3 /kg Futter eine lineare Beziehung zwischen Vitamin D_3 -Angebot und Eischalencalcifizierung besteht (35). Als Vitamin D_3 -Quelle wurde ein stabilisiertes Vitamin D_3 -Trockenkonzentrat ^{x)} mit besonders niedriger Vitamin D_3 -Beladung der einzelnen Partikel, verwendet.

Die Vitamin D_3 -arme Basalration der Depletionsperiode diene auch als Grundlage der Testrationen. Stabilisiertes Vitamin D_3 -Konzentrat wurde so zugesetzt, daß z.B. in Versuch I Standardrationen mit 80, 140 und 200 I.E. Vitamin D_3 /kg entstanden.

Die Testrationen wurden so gewählt, daß ihre vermuteten Vitamin D_3 -Konzentrationen zwischen den Standarddosierungen lagen. Dazu wurde den Untersuchungsproben der vom Hersteller deklarierte Vitamin D_3 -Gehalt zugrunde gelegt. Die Proben wurden mit der D_3 -armen Basalration vermischt, daß z.B. bei Standardrationen von 80, 140 und 200 I.E. D_3 /kg Prüfrationen mit einem Sollgehalt von 110 und 170 I.E. Vitamin D_3 /kg entstanden. (Beispiel: Weist die Untersuchungsprobe einen vom Hersteller deklarierten Vitamin D_3 -Gehalt von 5000 I.E. D_3 /kg auf, dann müssen für die Prüfration 110 I.E. D_3 /kg 22 g Probe ad 1 kg Basalration eingemischt werden).

Diese Futterationen wurden den depletierten Wachtelhennen bei Versuchsbeginn angeboten. Die Verteilung der einzelnen Rationen auf die Tiere erfolgte nach Zufall. Die Tiergruppen waren so im Raum angeordnet, daß eventuell auftretende Stalleinflüsse (z.B. Haltung oben/unten, rechte/linke Seite) auf alle Versuchsgruppen gleichmäßig verteilt waren.

^{x)} Stabilisiertes Vitamin D_3 -Trockenkonzentrat der Fa. Philips

3.1.5. Methodik der Eischalentrockengewichtsbestimmung:

Die Eier wurden in 2-tägigem Rhythmus, getrennt nach Untergruppen (Käfige) gesammelt. Sie wurden mit der Schere aufgeschnitten, mit destilliertem Wasser wurden Eiweiß und Eidotter aus der Schale herausgespült. Da sich die Schalenhaut nicht immer vollständig abtrennen ließ, wurde auf eine Ablösung verzichtet. In nummerierten Petrischalen wurden die Eischalen für 6 Stunden bei 105°C in den Trockenschrank verbracht. Nach 2-stündiger Abkühlung im Exsikkator erfolgte die Bestimmung des Eischalentrockengewichts auf 10^{-4} g genau. Aus dem gesamten Eischalentrockengewicht/Käfigeinheit (3 Tiere) in dem Versuchszeitraum wurde das Eischalentrockengewicht pro Tier und Versuchstag berechnet.

3.1.6. Auswertung der Ergebnisse:

Die Auswertung der Versuche erfolgte graphisch bzw. nach einem statistischen Modell. Im Anschluß an eine Depletionszeit besteht bei suboptimalem Vitamin D_3 -Angebot eine direkte lineare Beziehung zwischen Eischalentrockengewicht/Henne und Tag und der Vitamin D_3 -Aufnahme - ausgedrückt durch die Vitamin D_3 -Konzentration im Futter (I.E./kg) -. Aus der Übereinstimmung bzw. Abweichung der Ergebnisse der Früfrationen mit bzw. von denen der Standardrationen wurde der Vitamin D_3 -Gehalt der Probe bestimmt.

Für die Korrelation zwischen täglichem Eischalentrockengewicht pro Tier, das aus dem Mittel der Ergebnisse einer Versuchsperiode errechnet wurde, und der korrespondierenden Vitamin D_3 -Konzentration im Futter wurde die Regressionsgerade berechnet ($y = bx + a$; wobei y das Eischalentrockengewicht/Tier und Tag, und x die Vitamin D_3 -Konzentration darstellt). Damit ergab sich der Schätzwert des Titers aus dem Verhältnis der Steigungen der Standard- und der Testgerade (18).

Beispiel: Die Abhängigkeit Eischalentrockengewicht/Tier und Tag vom Vitamin D_3 -Angebot im Futter soll im Folgenden an einem Modell verdeutlicht werden. Eine Futterprobe mit einem deklarierten Sollgehalt von 2000 I.E. D_3 /kg soll auf ihre Vitamin D_3 -Wirksamkeit untersucht werden.

Es wird angenommen, daß für die Standardkonzentrationen 80, 140 und 200 I.E. D_3 /kg Eischalentrockengewichte von 100, 250 bzw. 400 mg/Tier und Tag ermittelt wurden. Damit besteht eine direkte lineare Beziehung zwischen Eischalentrockengewicht/Tier und Tag und der verabreichten Vitamin D_3 -Konzentration. In diesem Falle lautet die Gleichung für die Regressionsgerade : $y = 2,5 x - 100$ (Vgl. Abbildung 2)

Für die bestimmten Eischalentrockengewichte der Testrationen 110 und 170 I.E. D_3 /kg müssen in Bezug auf ihre Lage zur Standardgeraden 3 Möglichkeiten diskutiert werden:

1. Im Idealfall (deklariierter Gehalt = experimentell ermittelter Gehalt) liegen die Eischalentrockengewichte der beiden Prüfrationen mit 175 und 325 mg/Tier und Tag auf der Standardgeraden. Bei der Herstellung der Testrationen wurden genau 110 bzw. 170 I.E. D_3 /kg in die Basalration eingemischt.
2. Liegen die Testpunkte mit 150 bzw. 284 für die Prüfrationen 110 und 170 I.E. D_3 /kg unterhalb der Standardgeraden, deutet dies auf einen Vitamin D_3 Untergehalt der Probe hin, d.h. die tatsächliche Vitamin D_3 Wirksamkeit der Probe entspricht nicht dem deklarierten Sollwert.

Mit Hilfe der geometrischen Darstellung kann ein Schätzwert für den Titer der Untersuchungsprobe angegeben werden. Durch die Testpunkte (110 und 170 I.E. D_3 /kg) werden 2 Parallelen zur Abszisse gelegt und der Schnittpunkt mit der Regressionsgeraden bestimmt. Aus den entsprechenden Abszissenwerten für die Schnittpunkte wird das arithmetische Mittel gebildet und durch 140 (Mittel aus 110 und 170) dividiert. Der Quotient stellt den Schätzwert des Titers dar. Durch Multiplikation des Titers mit dem angenommenen Sollgehalt errechnet sich der Vitamin D_3 Gehalt der Untersuchungsprobe.

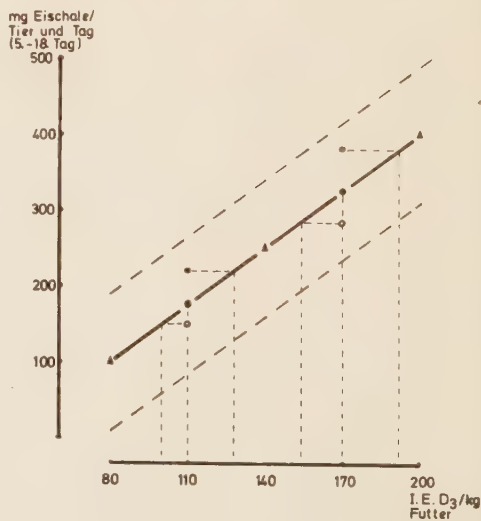
Im vorliegenden Falle wurde der Vitamin D_3 Gehalt mit 1815 I.E./kg (Sollwert: 2000 I.E./kg) bestimmt.

3. Wenn sich als weitere Möglichkeit die Eischalentrockengewichte für die Prüfrationen 110 und 170 I.E. Vitamin D₃/kg mit 220 bzw. 380 mg/Tier und Tag ergeben, so liegen die entsprechenden Testpunkte oberhalb der Standardgeraden. Die Vitamin D₃-Wirksamkeit der untersuchten Probe ist im Vergleich zum mitgeführten Standard größer, was auf einen höheren Vitamin D₃-Gehalt der Probe gegenüber dem deklarierten Sollwert schließen läßt. Nach Abbildung 2 weist die Probe eine Vitamin D₃-Konzentration von 2 285 I.E./kg auf.

Der Vorteil dieser graphischen Darstellung liegt darin, daß sie ohne den umständlichen Rechenapparat auskommt, wie er für die Berechnung des Titors notwendig ist, und daß man in kurzer Zeit einen Näherungswert für den wahrscheinlichen Vitamin D₃-Gehalt einer Testsubstanz angeben kann. Dagegen bietet das graphische Verfahren keine Möglichkeit, den Fehler des Titors abzuschätzen und Vertrauensgrenzen für den wahren Wert anzugeben.

Die Wertbemessung der zu prüfenden Proben erfolgte durch Vergleich der Steigungen der beiden Wirkungsgeraden, d.h. der Geraden, die durch die Standardrationen bzw. Prüfrationen festgelegt waren. Es wurde ein Verfahren angewandt, das an keine Bedingungen hinsichtlich der Anzahl von Dosen für die einzelnen Präparationen gebunden war (18). Aus den Versuchsdaten wurde mit Hilfe einer statistischen Vorlage der wahrscheinliche Titer errechnet. Durch Multiplikation des Titors mit dem Sollgehalt der Probe ergab sich der im Test bestimmte Vitamin D₃-Gehalt.

Abb.:2 Eischalentrockengewicht in Abhängigkeit von der Vitamin D₃-Konzentration im Futter (Modell)
Standardgerade:
 $y = 2,5 x - 100 \pm 90$ —▲
Probenmaterial: Futterprobe
Soll: 2000 I.E. D₃/kg



Rechenbeispiel nach CAVALLI-SFORZA (1969):

	<u>Standardrationen</u>			<u>Prüfrationen</u>		
I.E. Vitamin	80	140	200	110	170	
D ₃ /kg Futter (x)	S ₁	S ₂	S ₃	T ₁	T ₂	
Eischalentrockenge-						
wicht (mg/Tier u. Tag)	95	246	412	188	340	
(y)	84	265	388	192	301	
	102	238	374	150	308	
	119	251	426	170	351	
Sy	400	1000	1600	700	1300	SSy: 5000
n	4	4	4	4	4	Sn: 20
y	100	250	400	175	325	

$$Sx_S = x_{S1} \cdot n_{S1} + x_{S2} \cdot n_{S2} + x_{S3} \cdot n_{S3} = \underline{1\ 680}$$

$$Sx_T = x_{T1} \cdot n_{T1} + x_{T2} \cdot n_{T2} = \underline{1\ 120}$$

$$Sx_S x_S = x_{S1}^2 \cdot n_{S1} + x_{S2}^2 \cdot n_{S2} + x_{S3}^2 \cdot n_{S3} - \frac{(Sx_S)^2}{Sn} = \underline{122\ 880}$$

$$Sx_T x_T = x_{T1}^2 \cdot n_{T1} + x_{T2}^2 \cdot n_{T2} - \frac{(Sx_T)^2}{Sn} = \underline{101\ 280}$$

$$Sx_S x_T = - \frac{(Sx_S) \cdot (Sx_T)}{Sn} = \underline{-94\ 080}$$

$$Sx_S y = x_{S1} \cdot Sy_{S1} + x_{S2} \cdot Sy_{S2} + x_{S3} \cdot Sy_{S3} - \frac{(Sx_S) \cdot (SSy)}{Sn} = \underline{72\ 000}$$

$$Sx_T y = x_{T1} \cdot Sy_{T1} + x_{T2} \cdot Sy_{T2} - \frac{(Sx_T) \cdot (SSy)}{Sn} = \underline{18\ 000}$$

$$\text{Schätzwert des Titors R: } \frac{(Sx_S x_S) \cdot (Sx_T y) - (Sx_S x_T) \cdot (Sx_S y)}{(Sx_T x_T) \cdot (Sx_S y) - (Sx_S x_T) \cdot (Sx_T y)} = \underline{1}$$

Varianzanalyse:

Summe der Abweichungsquadrate

a) "insgesamt": 230 546

b) "zwischen den Dosen": 225 000

c) "innerhalb der Dosen": 5 546

s² : 369,7

d) "für die Regression": 225 000

e) "von der Regression": 0

$$\text{Varianz (R): } \frac{s^2 \cdot (Sx_S x_S + 2 \cdot R \cdot Sx_S x_T + R^2 \cdot Sx_T x_T) [(Sx_S x_S) \cdot (Sx_T x_T) - (Sx_S x_T)^2]}{[(Sx_S y) \cdot (Sx_T x_T) - (Sx_T y) \cdot (Sx_S x_T)]^2} = \underline{0,006}$$

Standardfehler des Titors: 0,0244

Für den errechneten Titer wurde über eine Varianzanalyse die Gültigkeitskontrolle vorgenommen. Die Gesamtvarianz wurde zerlegt in eine regressionsbedingte Varianz, eine zwar versuchsbedingte, aber von der Regression abweichende Varianz sowie die Restvarianz. Die Gültigkeitskontrolle des Titers wurde über eine Signifikanzprüfung der Varianz der Abweichung von der Regression vorgenommen. Damit war es möglich, die Zuverlässigkeit des ermittelten Titers im Hinblick auf mögliche Unsicherheiten zu kontrollieren, die auf Einflüssen fremder Faktoren (Verunreinigungen) beruhen und so die spezifische biologische Wirkung einer Probe verfälschen würden.

Der Standardfehler des Titers wird als Variationskoeffizient angegeben. Durch die Vertrauensgrenzen (95%-Konfidenzgrenzen), die sich durch Multiplikation des Standardfehlers mit den zugehörigen t-Wert ergeben, wird ein Wertebereich eingeschlossen, der den wahren, aber unbekannten Mittelwert des Titers mit 95%-Wahrscheinlichkeit enthält.

Um einen Anhaltspunkt für den Vergleich verschiedener Standardgeraden zu erhalten, der nicht durch die Streuung der Testproben beeinflusst wird, wurde für die einzelnen Standardkonzentrationsreihen die Standardabweichung der $\hat{y}$ -Werte für ein gegebenes x (Standardfehler der Schätzung) nach folgender Formel berechnet (5%):

$$s_{y.x} = \sqrt{\frac{\sum (y - a - b_{yx}x)^2}{n-2}}$$

Der Zähler unter der Wurzel stellt die Summe der Quadrate der Abweichungen der beobachteten y -Werte von den entsprechenden Werten auf der Regressionsgeraden dar. Diese Summe wird durch die um zwei verminderte Wiederholungszahl geteilt. Die Wurzel daraus ergibt dann den Standardfehler der Schätzung. Es ergeben sich zwei Parallelen zur Regressionslinie im Abstand von $2s_{y.x}$, die ein Band bilden, das etwa 95% aller Beobachtungen einschließt. Vergleiche dazu Abbildung 2.

3.2. Versuch I:

In den Versuchen I, II, III und IVB1 wurde das Vitamin D₃-Standardkonzentrat so in die Vitamin D₃-arme Basalration (Tab.1) eingemischt, daß Standardrationen mit einem Vitamin D₃-Gehalt von 80, 140 und 200 I.E./kg entstanden. Entsprechend sollten die Testrationen auf einen Gehalt von 110 I.E. und 170 I.E. Vitamin D₃/kg eingestellt werden.

In Versuch I sollten je eine Probe Milchaustauschfutter zur Kälbermast mit einem deklarierten Vitamin D₃-Gehalt von 3 000 I.E./kg und Schweinemastalleinfutter I mit einem Sollgehalt von 700 I.E. Vitamin D₃/kg auf ihre Vitamin D₃-Wirksamkeit untersucht werden.

3.2.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung:

Vor Versuchsbeginn wurden ca. 200 Legewachteln im Alter von 25 Wochen, (die bereits zu einem früheren orientierenden Versuch mit ähnlicher Fragestellung verwendet wurden), mit einer Vitamin D₃-armen Basalration ernährt (Tab.1). Nach der 17-tägigen Depletionszeit ergab die Eischalentrockengewichtsbestimmung einen Wert von 11,9 mg pro Tier und Tag.

Anschließend erhielten jeweils 8x3 Wachtelhennen die Standardrationen (80, 140 und 200 I.E. Vitamin D₃/kg Basalration). Milchaustauschfutter (Sollwert: 3000 I.E. Vitamin D₃/kg) und Schweinemastalleinfutter (Sollwert: 700 I.E. Vitamin D₃/kg) wurden so mit der Vitamin D₃-armen Basalration vermischt, daß Prüfrationen mit jeweils 110 I.E. und 170 I.E. Vitamin D₃/kg entstanden. Die 4 Testrationen wurden je 10x3 (Testration Milchaustauschfutter 170 I.E. Vitamin D₃/kg: 9x3) Wachtelhennen angeboten.

Die Versuchsdauer betrug 18 Tage, die Tierzahl bei Versuchsbeginn 189 Hennen. Bei einer Depletionsdauer von 17 Tagen und einer Testperiode von 18 Tagen betrug die Gesamt-Versuchszeit 5 Wochen.

Die weitere Versuchsdurchführung entsprach dem unter 3.1.3.-3.1.5. beschriebenen Verfahren.

Als Versuchs-kriterien dienten Eischalentrockengewicht/Tier und Tag, Körpergewichtsentwicklung, Futterverzehr sowie Sterblichkeitsrate. Als Meßperiode diente der 5.-18. Versuchstag.

3.2.2. Ergebnisse: Die Ergebnisse von Versuch I sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Tierzahl betrug bei Versuchsende 167 Wachtelhennen. Die Verluste (durchschnittlich 11,7%) zwischen den einzelnen Versuchsgruppen waren ausgeglichen. Eine Beziehung zwischen Versuchsgruppen und Mortalitätsrate war nicht erkennbar. Die Verluste waren auch nicht auf die versuchsbedingte Fütterung zurückzuführen, sondern gingen im wesentlichen zu Lasten der Käfigkonstruktion. Als hauptsächliche Todesursachen (80%) wurden Einklemmen in den Abdeckgittern der Futtergefäße, Strangulation zwischen den Drahtstäben der vorderen Käfigwand und Kannibalismus festgestellt.

Unterschiede zwischen Körpergewicht und Futterverzehr in den einzelnen Gruppen waren nicht zu erkennen. Damit wurden Körpergewicht und Futterverzehr der Wachtelhennen durch die suboptimale Vitamin D₃-Versorgung nicht beeinflusst.

Die abgestufte Vitamin D₃-Versorgung der depletierten Wachtelhennen beeinflusste erwartungsgemäß Legeleistung und Eischalencalcifizierung deutlich. So wurden für die Standardrationen mit 80, 140 und 200 I.E. Vitamin D₃/kg Futter, Eischalentreckengewichte von 46, 249 bzw. 450 mg/Tier und Tag gemessen. Für die Testrationen 110 I.E. und 170 I.E. Vitamin D₃/kg aus Schweinemast-(Milchaustausch)futter lagen die entsprechenden Werte bei 127 bzw. 424 (175 bzw. 366) mg Eischale/Tier und Tag. Wie aus Vorversuchen hervorging, beträgt bei einer normalversorgten Wachtelhenne mit einer Legeleistung von 70% das tägliche Eischalentreckengewicht ca. 450 mg.

Für die Korrelation zwischen Vitamin D₃-Konzentration im Futter und Eischalentreckengewicht/Tier und Tag wurde die Regressionsgerade berechnet und in Abbildung 3 wiedergegeben.

Sie folgt der Gleichung: $y = 3,37 x - 223,8$

Als Streuung um die Regressionsgerade ergab sich $s_{y.x} = \pm 90,3$. Damit waren zwei Parallelen zur Regressionslinie im Abstand von 90,3 festgelegt, die einen Bereich umgrenzten, der 95% aller Werte enthält.

Tabelle 3: Ergebnisübersicht Versuch I (Meßperiode: 5.-18. Tag)
 Probenmaterial: Schweinemastfutter (700 I.E. D₃/kg)
 Milchaustauschfutter (3000 I.E. D₃/kg)
 Standardrationen mit 80, 140 und 200 I.E. D₃/kg
 Prüfrationen mit 110 und 170 I.E. D₃/kg
Eischalentrockengewicht/Tier und Tag
Tierverluste, Futterverzehr und Gewichtsentwicklung
 Tierzahl: Versuchsbeginn 189
 Versuchsende 167

	<u>Standardrationen</u>			<u>Prüfrationen</u>			
				Schweinemast- futter		Milchaustausch- futter	
I.E. Vitamin D ₃ /kg Futter	80	140	200	110	170	110	170
Tierzahl	24	24	24	30	30	30	27
Wiederholungszahl	8	8	8	10	10	10	9
Verluste (%)	12	25	25	7	7	7	4

Eischalen- trockengewicht (mg/Tier u. Tag)	46	249	450	127	424	175	366
$\pm s_{\bar{x}}$	13,7	36,0	41,5	25,0	42,4	19,6	47,7

Futterverzehr (g/Tier und Tag)							
1.-6. Tag	20	18	22	17	20	20	20
7.-12. Tag	20	18	21	20	21	21	21
13.-18. Tag	20	20	21	19	21	21	21

Körpergewicht (g)							
Versuchsbeginn	145	148	148	146	143	145	150
Versuchsende	151	138	142	144	142	149	147

Ermittelte Vitamin D₃-Gehalte (I.E./kg): 752 3 125

Abb.: 3 Eischalentrockengewicht in Abhängigkeit von der Vitamin D₃-Konzentration im Futter (Versuch I)

Standardgerade: $y = 3,37 x - 223,8 \pm 90,3$ ▲ — ▲

Probenmaterial: Schweinemastfutter Soll: 700 I.E.D₃/kg ●

Milchaustauschfutter Soll: 3000 I.E.D₃/kg ■

mg Eischale/
Tier und Tag
(5.-18. Tag)

500

400

300

200

100

80

110

140

170

200 I.E.D₃/kg Futter

Tierzahl: Standard 8x3

8x3

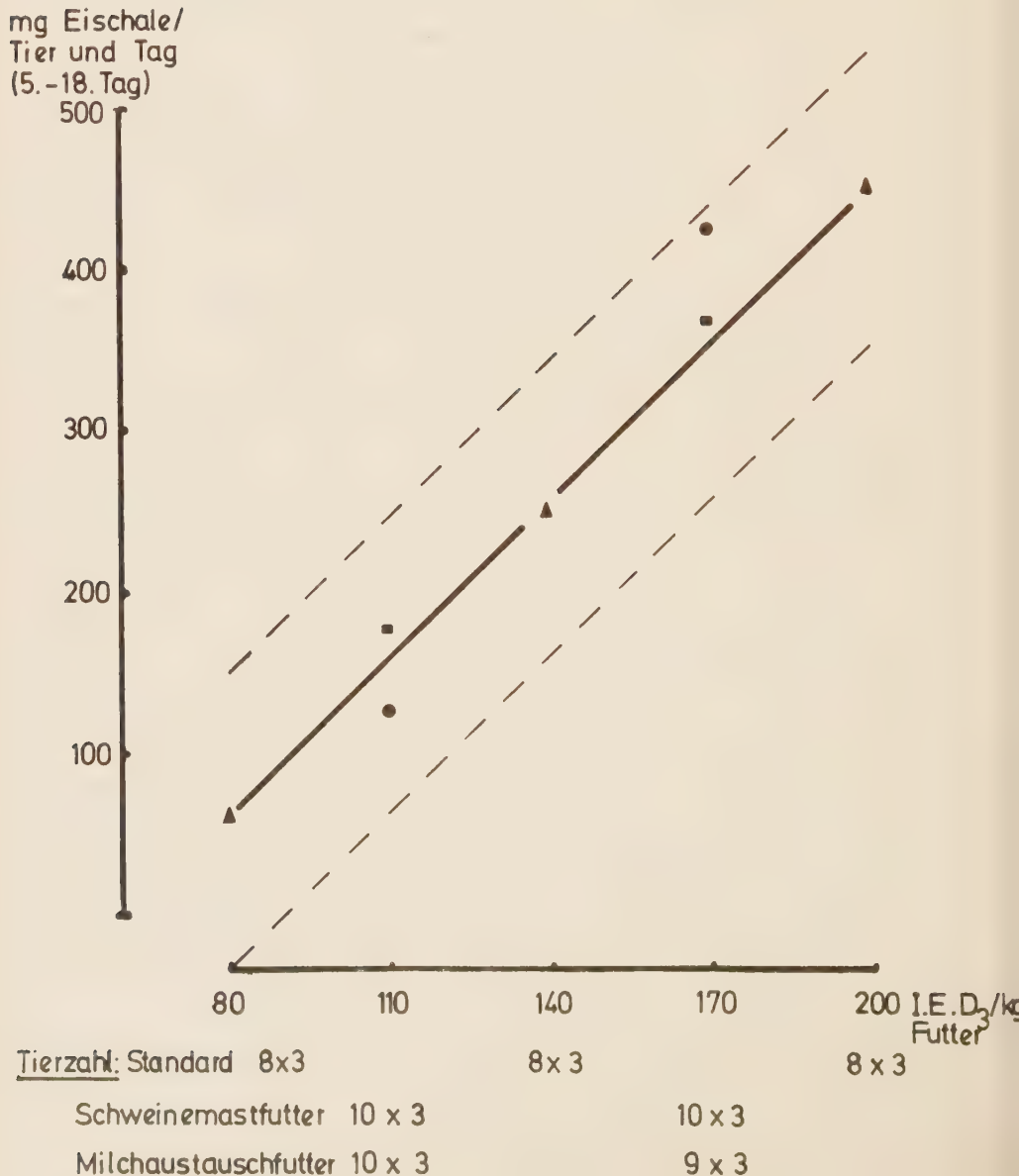
8x3

Schweinemastfutter 10 x 3

10 x 3

Milchaustauschfutter 10 x 3

9 x 3



Die statistische Wertbemessung war in diesem Versuch für beide Untersuchungsproben erlaubt.

Die (geschätzten) Titer der Testproben wurden mit 1,07 für das Schweinemastfutter und 1,04 für das Milchaustauschfutter errechnet. Die varianzanalytisch ermittelten Werte für die Variationskoeffizienten lagen bei $\pm 5,5\%$ bzw. $\pm 6\%$. Somit ergaben sich trotz der relativ hohen Streuung der Mittelwerte für die Standard- bzw. Prüfrationen absolut niedrige Variationskoeffizienten der Titer. Durch Multiplikation der tierexperimentell ermittelten Titer mit dem Sollwert der Proben ergab sich für das Schweinemastfertigfutter (Soll: 700 I.E.) ein Vitamin D₃-Gehalt von 752 I.E./kg, die Vertrauensgrenzen ($P < 0,05$) betrugen 665 und 833 I.E. Die entsprechenden Werte für die Probe Milchaustauschfutter (Sollwert: 3000 I.E. Vitamin D₃/kg) wurden mit 3 125 I.E. Vitamin D₃/kg bestimmt, der Konfidenzbereich ($P < 0,05$) reichte von 2 728 bis 3 523 I.E. Der vom Hersteller deklarierte Vitamin D₃-Gehalt der Untersuchungsprobe stimmte damit mit der gefundenen Vitamin D₃-Wirksamkeit überein.

3.3. Versuch II:

In Versuch II sollte die Vitamin D₃-Konzentration eines Eiweißkonzentrates für Schweine (Sollgehalt: 8 000 I.E. Vitamin D₃/kg) und eines Mineralfutters für Rinder (deklariertes Vitamin D₃-Gehalt: 80 000 I.E./kg) bestimmt werden.

3.3.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung:

141 ca. 32 Wochen alte Wachtelhennen (überlebende Tiere aus Versuch I) wurden nach einer 14-tägigen Depletionszeit die Standard- bzw. Prüfrationen angeboten. Der Grad der Vitamin D₃-Verarmung wurde während des Vorversuches nur geschätzt und nicht experimentell, d.h. über die Eischalentrockengewichtsbestimmung erfaßt.

6x3 Wachtelhennen erhielten die Standardration mit 80 I.E., je 8x3 Tiere die Standardrationen mit 140 und 200 I.E. Vitamin D₃/kg Futter.

Die zu untersuchenden Proben wurden so mit der Vitamin D_3 -armen Basalration verschnitten, daß Testrationen mit jeweils 110 I.E. und 170 I.E. Vitamin D_3 /kg entstanden. Die Testrationen wurden je 7x3 (Testration Eiweißkonzentrat 110 I.E. Vitamin D_3 /kg: 6x3) Wachtelhennen angeboten.

Die Versuchsdurchführung entsprach den unter 3.1.3.-3.1.5. beschriebenen Verfahren.

Die Versuchsdauer betrug 18 Tage. Am ersten und letzten Versuchstag wurden die Tiere einzeln gewogen; in 6-tägigem Abstand wurde der Futterverzehr gemessen. Das Eischalentrockengewicht wurde aus dem Mittel, der an zwei Tagen gelegten Eier bestimmt. Aus den Einzelbestimmungen zwischen 5. und 18. Versuchstag wurde der Mittelwert errechnet.

3.3.2. Ergebnisse: Tabelle 4 orientiert über Ergebnisse aus Versuch II. In diesem Versuch wurde die Anzahl der Wiederholungen von 10x3 in Versuch I auf 7x3 Wachtelhennen für die Testgruppen verringert. Die unterschiedliche Zahl der Wiederholungen (6x3 bzw. 8x3 für die Standardrationen und 7x3 bzw. 6x3 für die Testrationen) war durch Ausfall ganzer Käfeinheiten während der Untersuchung bedingt.

Die Tierzahl betrug bei Versuchsende 119 Wachtelhennen. Die Tierverluste (15,6%) verhielten sich unabhängig vom Gehalt des Futters an Vitamin D_3 , mit Ausnahme der Standardration 80 I.E. Vitamin D_3 /kg, deren Verlustquote mit 42% deutlich über dem Mittel der anderen Versuchsgruppen lag.

Der Futterverzehr pro Tier und Tag wies für die einzelnen Versuchsgruppen zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende keine Unterschiede auf.

Bezüglich der Körpergewichtsentwicklung ist ersichtlich, daß zwar keine Unterschiede zwischen den einzelnen Rationsgruppen bestanden, mit zunehmender Versuchsdauer aber eine Gewichtsabnahme aller Wachtelhennen erfolgte. Bei Beginn der Untersuchung wiesen die Wachtelhennen ein mittleres Körpergewicht von 149 g auf, bei Versuchsende betrug das Durchschnittsgewicht der Tiere noch 137 g.

Tabelle 4: Ergebnisübersicht Versuch IV (Meßperiode: 5.-18. Tag)

Probenmaterial: Eiweißkonzentrat (8000 I.E. D₃/kg)

Mineralfutter (80000 I.E. D₃/kg)

Standardrationen mit 80, 140 und 200 I.E. D₃/kg

Prüfrationen mit 110 und 170 I.E. D₃/kg

Fischalentrockengewicht/Tier und Tag

Tierverluste, Futterverzehr und Gewichtsentwicklung

Tierzahl: Versuchsbeginn 141

Versuchsende 119

	<u>Standardrationen</u>			<u>Prüfrationen</u>			
				Eiweiß- konzentrat		Mineral- futter	
I.E. Vitamin D ₃ /kg Futter	80	140	200	110	170	110	170
Tierzahl	12	24	24	18	21	21	21
Wiederholungszahl	6	8	8	6	7	7	7
Verluste (%)	42	17	21	6	10	15	15

Eischalen- trockengewicht (mg/Tier u. Tag)	68	204	423	183	355	389	430
$\pm s_{\bar{x}}$	11,8	32,9	50,8	53,3	40,6	74,8	31,2

Futterverzehr (g/Tier und Tag)							
1.-6. Tag	18	20	18	21	18	18	18
7.-12. Tag	20	22	21	22	21	21	19
13.-18. Tag	21	20	23	22	22	21	21

Körpergewicht (g)							
Versuchsbeginn	146	156	145	158	148	146	145
Versuchsende	136	136	137	143	134	138	136

Gemittelte Dosis in 15-Gabeinheiten (I.E./kg): 140 (Näherungswert)

Zwischen den Rationsgruppen mit den ansteigenden Vitamin D₃-Standardkonzentrationen und dem Eischalentrockengewicht/Tier und Tag bestand eine lineare Beziehung. Für die Korrelation Vitamin D₃-Versorgung und Eischalentrockengewicht/Tier und Tag wurde die Regressionsgerade mit $y = 2,96 x - 182,2$ bestimmt und in Abbildung 4 dargestellt.

Die Streuung um die Regressionsgerade wurde mit $s_{y.x} = \pm 104,2$ ermittelt.

Die statistische Wertbemessung war in diesem Versuch nur für die Probe Eiweißkonzentrat für Schweine (Sollgehalt: 8 000 I.E. Vitamin D₃/kg) erlaubt. Der errechnete Titer lag bei 1,08 mit einem Variationskoeffizienten von $\pm 8,5\%$. Durch Multiplikation des Titers mit dem deklarierten Gehalt ergab sich die Vitamin D₃-Konzentration der Probe mit 8 640 I.E./kg. Bei 5%-Irrtumswahrscheinlichkeit lag der wahre Wert zwischen 7 120 und 10 080 I.E.

Abbildung 4 veranschaulicht deutlich, daß die Gerade, die durch die Testpunkte (110 I.E. und 170 I.E. Vitamin D₃/kg) für die Probe Mineralfutter festgelegt ist, in ihrer Steigung erheblich von der Standardregressionslinie abweicht und somit kein gemeinsamer Schnittpunkt mit der y-Achse angenommen werden kann. Die ermittelten Eischalentrockengewichte ließen keine statistische Auswertung zu. (Wenn man trotzdem einen Titer angeben wollte, würde er für die Probe Mineralfutter für Rinder (Soll: 80 000 I.E. Vitamin D₃/kg) bei 1,46 liegen, was einem Vitamin D₃-Gehalt von 116 800 I.E./kg entsprechen würde).

Als Gründe für die Ungültigkeit der Wertbemessung können verschiedene Faktoren in Betracht gezogen werden. Für die Testrationen 110 I.E. und 170 I.E. Vitamin D₃/kg des Mineralfutters lagen die durchschnittlichen Eischalentrockengewichte mit 389 bzw. 430 mg hoch im Vergleich zu 204 bzw. 423 mg für die Standardrationen mit 140 und 200 I.E. Vitamin D₃/kg. Ursächlich kommt dafür ein Vitamin D₃-Übergewicht der Probe in Frage, d.h. daß der tatsächliche Vitamin D₃-Gehalt der untersuchten Probe über dem deklarierten Wert liegt, und so bei der Herstellung der Rationen höhere Vitamin D₃-Konzentrationen in die Basalration eingemischt wurden.

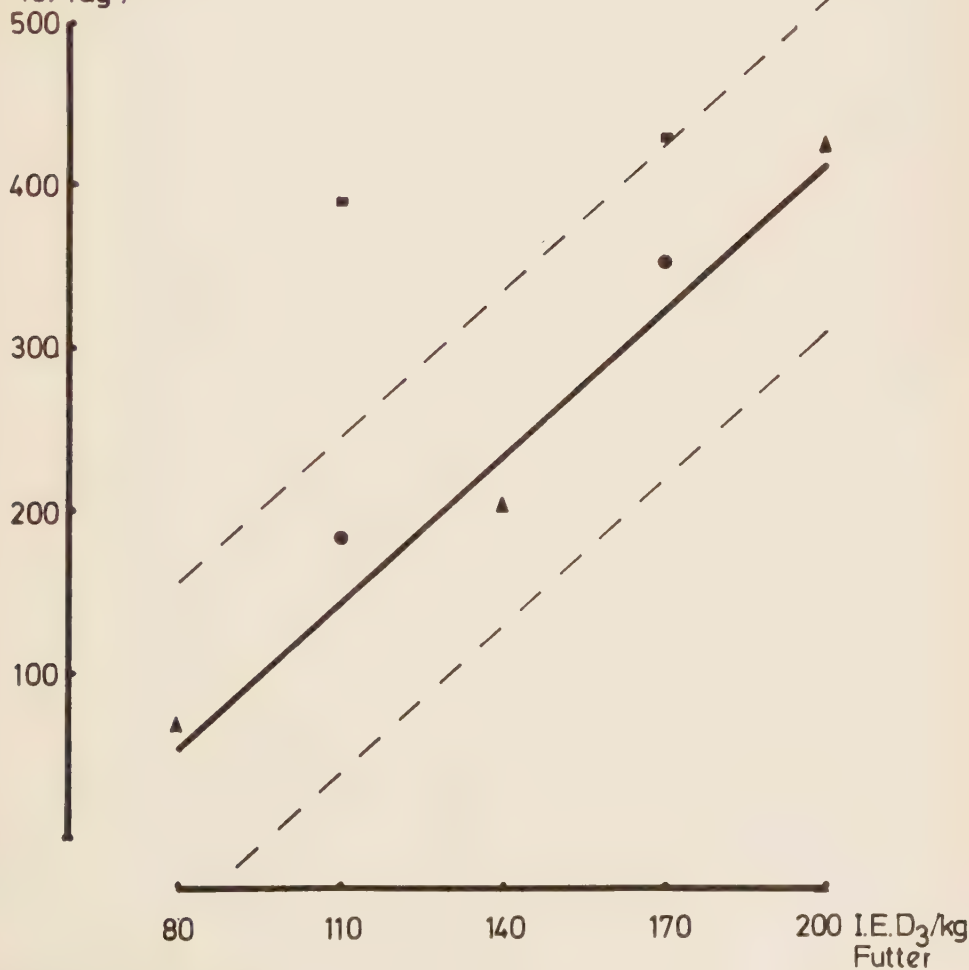
Abb.: 4 Eischalentrockengewicht in Abhängigkeit von der Vitamin D₃-Konzentration im Futter (Versuch II)

Standardgerade: $y = 2,9 x - 182,2 \pm 104,2$ ▲ —▲

Probenmaterial: Eiweißkonzentrat Soll: 8000 I.E.D₃/kg ●

Mineralfutter Soll: 80000 I.E.D₃/kg ■

mg Eischale/
Tier und Tag
(5.-18. Tag)



Tierzahl: Standard 6 x 3

8 x 3

8 x 3

Eiweißkonzentrat 6 x 3

7 x 3

Mineralfutter 7 x 3

7 x 3

Damit wäre die Vitamin D_3 -Konzentration in den Prüfrationen bereits in einen so hohen Vitamin D_3 -Konzentrationsbereich gerückt, daß keine lineare Beziehung zwischen Vitamin D_3 -Versorgung und Eischalentrockengewicht/Tier und Tag mehr erwartet werden darf.

Weiter muß auch ein Probennahmefehler erwogen werden. Durch den hohen Sollgehalt (80 000 I.E. Vitamin D_3 /kg) der Futterprobe bedingt, lag der Anteil Probenmaterial, der in die Basalration eingemischt werden mußte mit 0,1375% bzw. 0,2125% relativ nieder. Somit ist vorstellbar, daß keine völlig homogene Verteilung des Vitamin D_3 -Probengutes in der Basalration erfolgte. Diese Überlegung gewinnt noch zusätzlich an Bedeutung, wenn der mit 20 g/Tag absolut geringe tägliche Futterverzehr der Wachtelhenne in Rechnung gestellt wird.

3.4. Versuch III:

In Versuch III sollten jeweils eine Probe Legehennenalleinfutter (Soll: 1 000 I.E. Vitamin D_3 /kg) und Putenstarterfutter (Soll: 3 000 I.E. Vitamin D_3 /kg) auf ihre Vitamin D_3 -Wirksamkeit an der japanischen Wachtel untersucht werden. Beide Futterproben stammten aus Beständen, in denen der Verdacht auf Vorliegen eines Schadfutters geäußert wurde. Aus dem Vorbericht ging hervor, daß nach Verfütterung der Probe Legehennenalleinfutter in einem Legebestand von 2 000 Tieren wiederholt Erscheinungen von Knochenweiche aufgetreten sind. In einem Putenaufzuchtbestand erkrankten nach Verfütterung des Putenstarterfutters junge Puten an Erscheinungen von "Knochenlähme" (Rachitis). Von den ca. 18 000 Tieren verendeten an einem Tage über 500 Puten.

Die Diagnosen waren in beiden Fällen fast gleichlautend, so daß die Futterbeschaffenheit, insbesondere die Vitaminierung (Vitamin D_3) und der Calcium- bzw. Phosphorgehalt der Proben in Frage gestellt werden mußten. Aus diesem Grunde sollten die Proben auf ihren Vitamin D_3 -Gehalt sowie den Calcium- und Phosphorgehalt untersucht werden.

Es muß angemerkt werden, daß unphysiologische Calcium- und Phosphorkonzentrationen im Probenfutter, an die in Anbetracht der Anamnese gedacht werden muß, sich auf die Ergebnisse des biologischen Testes erfahrungsgemäß nicht störend auswirken werden (77).

Einerseits muß für die Herstellung der Testrationen (für Prüfration 110 I.E. Vitamin D_3 /kg 3,66% des Putenstarterfutters, Soll: 3 000 I.E.) nur wenig Probenmaterial in die Vitamin D_3 -arme Basalration eingemischt werden. Andererseits beeinflussen Verschiebungen des Calcium-Phosphor-Verhältnisses in einem relativ weiten Bereich (2-4% Ca bei 0,5-1,5% P) den biologischen Test nicht.

3.4.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung:

135 ca. 11 Wochen alte Wachtelhennen wurden erstmals für diese Untersuchung verwendet. Nach einer 26-tägigen Vorbereitungsperiode wurde ein Depletionsstand von 32 mg Eischale/Tier und Tag gemessen.

Anschließend wurden den Tieren die Futterrationen von Versuch III angeboten. Jeweils 6x3 Wachtelhennen erhielten die Standardrationen mit 80, 140 und 200 I.E. Vitamin D_3 /kg.

Die Einmischungskonzentrationen für die Untersuchungsproben wurden so gewählt, daß auch ein eventueller Vitamin D_3 -Unter-gehalt sicher bestimmt werden konnte. So wurden für das Putenstarterfutter Prüfrationen mit 110, 170, 200 und 220 I.E. bzw. für das Legehennenalleinfutter Prüfrationen mit 110, 170 und 220 I.E. Vitamin D_3 /kg, gebildet.

Die Testrationen des Putenstarterfutters wurden je 4x3 (Dosis: 200 I.E. Vitamin D_3 /kg 3x3) Wachtelhennen angeboten. Das Legehennenalleinfutter wurde so mit der Vitamin D_3 -armen Basalration vermischt, daß Testrationen mit jeweils 110, 170 und 220 I.E. Vitamin D_3 /kg entstanden, die je 4x3 Wachtelhennen erhielten.

Die Zahl der Prüfrationen wurde auf Kosten der Wiederholungen auf 4 bzw. 3 erhöht, da die erwartbare Vitamin D_3 -Konzentration in Anbetracht des Vorberichts (rachitische Symptome) nur unsicher geschätzt werden konnte.

Der Versuch dauerte 18 Tage. Das Eischalentrockengewicht wurde zwischen 5. und 18. Versuchstag bestimmt.

Bei Testbeginn und Testende wurden die Versuchstiere einzeln gewogen sowie in 6-tägigem Abstand der Futterverzehr gemessen.

Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte nach der gleichen Methode, wie sie in Versuch I und Versuch II angewendet wurde.

3.4.2. Ergebnisse: Über Ergebnisse informiert Tabelle 5.

Bei Testende betrug die Tierzahl 120 Wachtelhennen. Die Mortalitätsrate (im Mittel 11,1%) ließ keine Beeinflussung durch die unterschiedliche Vitamin D₃-Versorgung der einzelnen Versuchsgruppen erkennen. Zwischen Futterverzehr bzw. Körpergewichtsentwicklung und den verschiedenen Vitamin D₃-Konzentrationen bestand ebenfalls keine Beziehung.

In Abbildung 5 ist der Verlauf der Regressionsgeraden für die Standardrationen wiedergegeben. Sie folgt der Gleichung $y = 2,45 x - 99$. Die Streuung um die Regressionslinie ($s_{y,x}$) lag bei ± 110 .

Die Wertbemessung konnte für beide untersuchten Proben als erlaubt angesehen werden. Für die Probe Putenstarterfutter konnte der Sollgehalt von 3 000 I.E. mit $2940 \pm 9\%$ I.E. Vitamin D₃/kg innerhalb der Vertrauensgrenzen bestätigt werden. (Vertrauensgrenzen $P < 0,05$: 2430 und 3480 I.E. Vitamin D₃/kg). Für die Probe Legehennenalleinfutter (Soll: 1 000 I.E. Vitamin D₃/kg) ergab sich mit 708 I.E. Vitamin D₃/kg ein Untergehalt, der - bei Vertrauensgrenzen von 520 und 890 I.E. Vitamin D₃/kg- mit $P < 0,05$ mindestens 11% (unter Zugrundelegung von 890 I.E.) betrug.

Durch Verminderung der Wiederholungszahl für die Test- und Prüfrationen stieg der Variationskoeffizient des Titors im Vergleich zu den ersten beiden Versuchen ($\pm 5,5\%$, $\pm 6\%$, $\pm 8,5\%$) auf $\pm 9\%$ bzw. $\pm 13\%$ an.

Die Analyse der Futterproben ergab einen Calciumgehalt von 1,90% im Putenstarterfutter (Asche 7,75%) bzw. 3,7% im Legehennenalleinfutter (Asche 8,98%). Die Werte für Phosphor lagen bei 1,07% für das Putenstarterfutter bzw. 0,91% für das Legehennenfutter.

Tabelle 5: Ergebnisübersicht Versuch III (Meßperiode: 5.-18. Tag)
 Probenmaterial: Putenstarterfutter (3000 I.E. D₃/kg)
 Legehennenalleinfutter (1000 I.E. D₃/kg)
 Standardrationen mit 80, 140 und 200 I.E. D₃/kg
 Prüfrationen mit 110, 170, 200 und 220 I.E. D₃/kg
Eischalentrockengewicht/Tier und Tag
Tierverluste, Futterverzehr und Gewichtsentwicklung
 Tierzahl: Versuchsbeginn 135
 Versuchsende 120

	<u>Standardrationen</u>			<u>Prüfrationen</u>						
				<u>Putenstarter- futter</u>				<u>Legehennen- alleinfutter</u>		
I.E. Vitamin D ₃ /kg Futter	80	140	200	110	170	200	220	110	170	220
Tierzahl	18	18	18	12	12	9	12	12	12	12
Wiederholungs- zahl	6	6	6	4	4	3	4	4	4	4
Verluste (%)	6	22	6	-	-	33	-	8	24	16
Eischalen- trockengewicht (mg/Tier u. Tag)	73	291	367	118	368	367	431	74	172	301
$\pm \bar{s}_x$	21,5	66,1	31,0	10,0	64,9	52,4	52,6	26,0	37,6	82,5
Futterverzehr (g/Tier und Tag)										
1.-6. Tag	19	16	16	15	16	17	18	15	18	16
7.-12. Tag	18	18	16	15	17	18	18	15	19	19
13.-18. Tag	18	19	20	17	20	22	19	19	18	18
Körpergewicht (g)										
Versuchsbeginn	141	141	146	134	141	135	139	145	134	144
Versuchsende	142	141	144	131	141	135	140	144	135	139
Ermittelte Vitamin D ₃ -Gehalte (I.E./kg):	2 940							708		

Abb.: 5 Eischalentrockengewicht in Abhängigkeit von der Vitamin D₃-Konzentration im Futter (Versuch III)
 Standardgerade: $y = 2,45 x - 99 \pm 110$ ▲—▲
 Probenmaterial: Putenstarterfutter Soll: 3000 I.E.D₃/kg ●
 Legehennenalleinfutter Soll: 1000 I.E.D₃/kg ■

mg Eischale/
 Tier und Tag
 (5-18. Tag)

500

400

300

200

100

80

110

140

170

200

220

I.E.D₃/kg Fut

Tierzahl: Standard 6x3

6x3

6x3

Putenstarterfutter 4x3

4x3

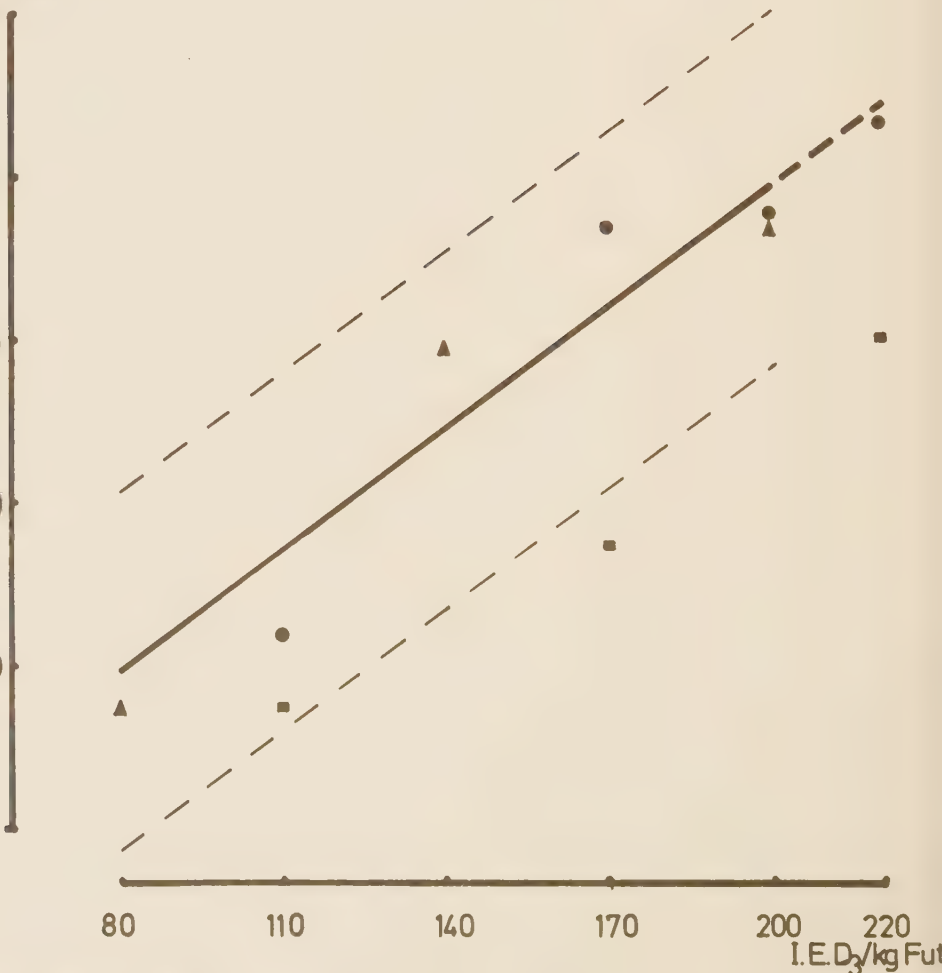
3x3

4x3

Legehennenalleinfutter 4x3

4x3

4x3



In Anbetracht dieser Ca- und P-Konzentrationen ist nach Untersuchungen von ZUCKER et al. (1970) eine Beeinflussung der Beziehung Vitamin D₃-Versorgung und Eischalentrockengewicht/Tier und Tag mit Sicherheit nicht zu erwarten.

Die durchgeführten Untersuchungen der beiden Futterproben hinsichtlich ihres Ca-, P- und Vitamin D₃-Gehaltes ließen keinen Zusammenhang zu den beobachteten Schadfällen erkennen. Diese Feststellung trifft auch für die Probe Legehennenalleinfutter zu. Eine Konzentration von 520 I.E. Vitamin D₃/kg Futter sollte den Vitamin D₃-Bedarf von Legehennen decken. Die tierexperimentell ausgewiesene Unterschreitung des deklarierten Vitamin D₃-Gehalts ist dabei nur von forensischer Bedeutung und steht in keiner Beziehung zu den beobachteten Symptomen der "Inochenweiche".

3.5. Versuch IVA:

In den folgenden Versuchen (IVA - VII) sollte geklärt werden, in wieweit eine Verkürzung der Meßdauer (bisher 5. bis 18. Versuchstag) bei entsprechender Änderung der Standardkonzentrationsreihe die Genauigkeit des Testes beeinflusst.

In Versuch IVA sollte ein Eiweißkonzentrat für Schweine mit dem Sollgehalt von 8 000 I.E. Vitamin D₃/kg (das auch in Versuch II verwendet wurde) mit Hilfe der Standardkonzentrationsreihe 140, 200 und 260 I.E. Vitamin D₃/kg und einer Meßperiode vom 3.-12. Versuchstag, untersucht werden.

3.5.1. Material und Versuchsdurchführung

68 Wachtelhennen wurden im Alter von ca. 38 Wochen zum 4. Mal für einen Versuch verwendet. Die Versuchsdurchführung unterschied sich von der in den anderen Versuchen dadurch, daß die Versuchstiere zu je 5x3 Tieren für die Standard- bzw. 4x3 für die Prüfrationen aufgeteilt und in kommerziell hergestellten Legebatterien ^x gehalten wurden. Der Stallraum wurde mit zwei 100-Watt-Lampen ganztägig beleuchtet; eine Verdunklung war aus versuchstechnischen Gründen nicht möglich. Die Raumtemperatur betrug durchgehend etwa 18°C.

^xLegebatterien der Fa. Favor, Tomblaine, Frankreich

Nach einer 12 Tage dauernden Depletion betrug das durchschnittliche Eischalentrockengewicht 108 mg/Tier und Tag. Anschließend bekamen je 5x3 Wachtelhennen ein Futter mit 140, 200 und 260 I.E. Vitamin D₃/kg Basalration. Die Prüfrationen wurden mit jeweils 170 und 230 I.E. Vitamin D₃/kg je 4x3 Tieren angeboten. Die Versuchsdauer betrug 18 Tage. Als Meßperiode diente die Zeit zwischen 3. und 12. Versuchstag.

Aus versuchstechnischen Gründen mußte eine Bestimmung des Futterverzehrs entfallen. Nachdem in den vorangegangenen Versuchen keine Beziehung zwischen Vitamin D₃-Angebot im Futter und der Körpergewichtsentwicklung bestand, wurde in diesem und den folgenden Versuchen auf ein Wiegen der Versuchstiere verzichtet.

3.5.2. Ergebnisse: Die Ergebnisse von Versuch IVA sind in Tabelle 6 wiedergegeben. Bei Versuchsende betrug die Tierzahl 58 Wachtelhennen. Die Verluste (im Durchschnitt 14,7%) in den einzelnen Versuchsgruppen waren annähernd ausgeglichen. Es bestand keine Abhängigkeit zwischen Vitamin D₃-Versorgung und Mortalitätsrate.

Die Eischalentrockengewichte/Tier und Tag waren positiv korreliert mit dem Vitamin D₃-Angebot aus den einzelnen Futterrationen.

Die Regressionsgerade nahm mit $y = 1,18 x - 32,66 \pm 79,2$ im Vergleich zu den vorherigen Versuchen (Steigungskoeffizienten von 2,02 - 3,37) einen deutlich flacheren Verlauf (Abb. 6). Zur Erklärung bieten sich mehrere Ursachen an. Wie bei der Legehenne nimmt auch bei der japanischen Wachtel mit zunehmenden Lebensalter die Legeleistung kontinuierlich ab. Somit kann angenommen werden, daß bei den in diesem Versuch verwendeten 38 Wochen alten Tieren mit einer generell niedrigeren Legeleistung (ca. 60%) zu rechnen war. Auch eine nahezu optimale Vitamin D₃-Zufuhr kann in diesem Fall kein Ansteigen der Legeleistung auf Werte, wie sie für junge Wachteln als normal gelten, bewirken. Der Unterschied in der Legeleistung und damit auch im Eischalentrockengewicht/Tier und Tag in den Rationsgruppen mit abgestuften Vitamin D₃-Konzentrationen wird dadurch geringer.

Tabelle 6: Ergebnisübersicht Versuch IVA (Meßperiode: 3.-12.Tag)

Probenmaterial: Eiweißkonzentrat (8 000 I.E. D₃/kg)

Standardrationen mit 140, 200 und 260 I.E. D₃/kg

Prüfrationen mit 170 und 230 I.E. D₃/kg

Fischalentrockengewicht/Tier und Tag, Tierversuche

Tierzahl: Versuchsbeginn 68

Versuchsende 58

	<u>Standardrationen</u>			<u>Prüfrationen</u> Eiweißkonzentrat	
I.E. Vitamin D ₃ /kg Futter	140	200	260	170	230
Tierzahl	15	14	15	12	12
Wiederholungszahl	5	5	5	4	4
Verluste (%)	13	28	13	17	-
Fischalentrocken- gewicht (mg/Tier und Tag)	140	190	282	242	379
$\pm s_{\bar{x}}$	30,8	37,3	40,9	59,7	87,7
Ermittelter Vitamin D ₃ -Gehalt (I.E./kg)				11 440	

Abbildung 6 zeigt deutlich, daß sich die relativ hohe Ausgangsleistung (108 mg Fischale/Tier und Tag) der Wachtelhennen bei Versuchsbeginn sowohl auf den Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Ordinate (a), als auch auf die Steigung (b) der Regressionsgeraden auswirkt. Je höher der Depletionsstand (d.h. je geringer die Ausgangsleistung) der Tiere bei Testbeginn ist, umso steiler verläuft die Regressionsgerade. Diese Feststellung ergibt sich auch aus den Versuchen I und III. Ausgangsleistung und Steigungskoeffizient von Versuch IVA ordnen sich in dieses Bild ein.

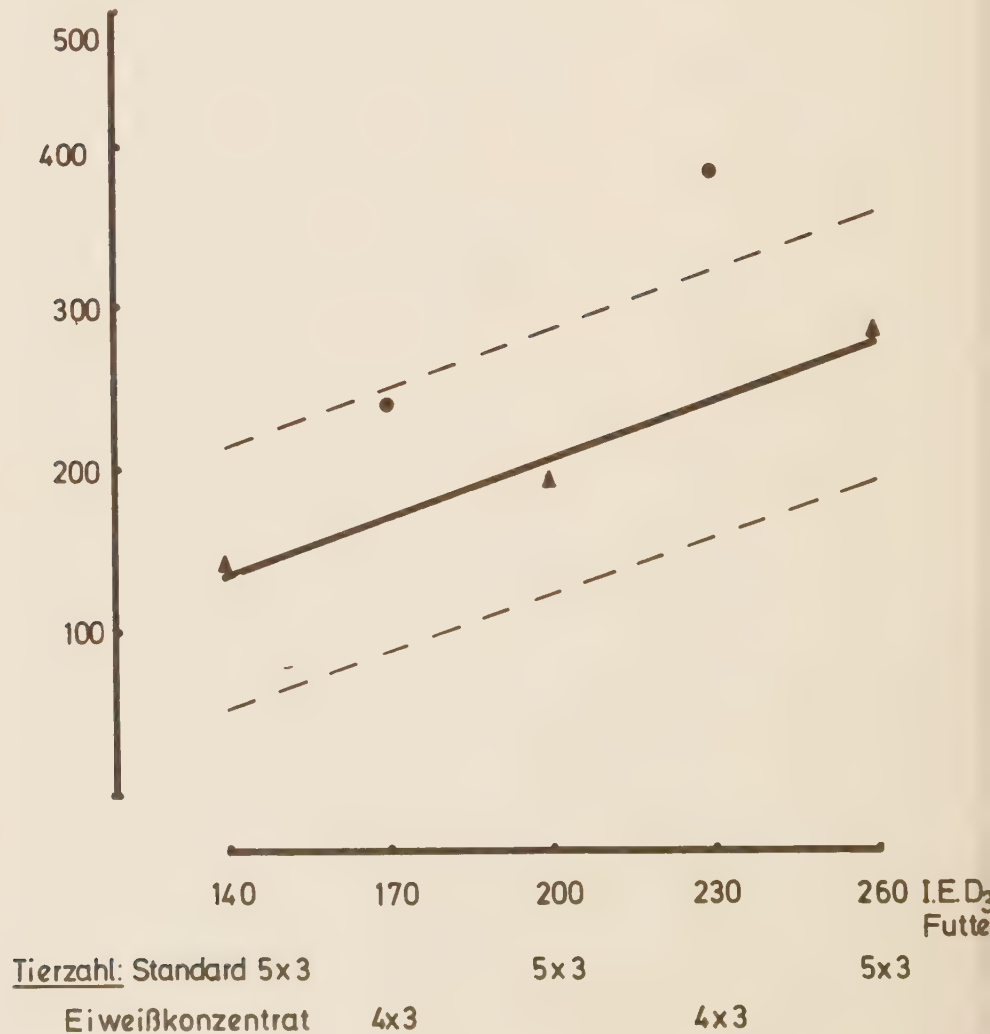
Versuch I: Ausgangsleistung: 11,9 mg b = 3,37 a = -223,8

Versuch III: " : 32 mg b = 2,45 a = -99

Versuch IVA: " : 108 mg b = 1,18 a = -32,66

Abb.: 6 Eischalentrockengewicht in Abhängigkeit von der Vitamin D₃-Konzentration im Futter (Versuch IV A)
Standardgerade: $y = 1,18 x - 32,7 \pm 79,2$ ▲—▲
Probenmaterial: Eiweißkonzentrat Soll: 8000 I.E.D₃/kg

mg Eischale/
Tier und Tag
(3.-12. Tag)



Als weitere Ursache für den flachen Verlauf der Standardgerade muß angeführt werden, daß durch die Verlegung der Versuchsperiode vom 5.-18. (Versuche I-III) auf den 3.-12. Versuchstag und durch deren Verkürzung, die Wachtelhennen möglicherweise nicht in der Lage waren, in der kürzeren Zeit mit einer entsprechenden Anhebung der Eischalencalciumausscheidung auf höhere Vitamin D₃-Gaben zu reagieren.

Die statistische Wertbemessung war hier für die untersuchte Probe erlaubt. Die Berechnung des Titors ergab einen Wert von $1,43 \pm 19\%$; durch Multiplikation mit dem Sollwert wurde für das Eiweißkonzentrat ein Vitamin D₃-Gehalt von 11 440 I.E./kg bestimmt. Die Vertrauensgrenzen ($P < 0,05$) betrugen 6 965 und 15 930 I.E. Der Titer-Variationskoeffizient lag mit $\pm 19\%$ wesentlich höher als in den vorherigen Versuchen.

3.6 Versuch IVB:

Mit einem Titer-Variationskoeffizienten von $\pm 19\%$ erbrachte die in Versuch IVA erstmalig angewandte Standardkonzentrationsreihe kein voll befriedigendes Ergebnis. Deshalb sollten im nächsten Versuch die Vitamin D₃-Konzentrationen für die einzelnen Rationen, bei gleichzeitiger Verkürzung der Meßperiode, weiter erhöht werden. Die erzielten Meßresultate sollten mit der in den Versuchen I-III verwendeten Standardreihe (80, 140 und 200 I.E. Vitamin D₃/kg) verglichen werden. Nachdem in Versuch II eine Wertbemessung für die Mineralstoffmischung für Rinder (Soll: 80 000 I.E. Vitamin D₃/kg) nicht erlaubt war, sollte die gleiche Probe jetzt mit zwei verschiedenen Standardkonzentrationsreihen auf ihre Vitamin D₃-Wirksamkeit untersucht werden.

3.6.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung:

130 ca. 17 Wochen alte Wachtelhennen wiesen nach einer 13-tägigen Depletionszeit ein mittleres Eischalentrockengewicht von 40,7 mg/Tier und Tag auf. Anschließend erhielten je 12-15 Wachtelhennen in Versuch IVB1 Rationen mit 80, 140 und 200 I.E. Vitamin D₃/kg. In Versuch IVB2 bekamen je 5x3 Tiere ein Futter mit 100, 200 und 300 I.E. Vitamin D₃/kg.

Die Probe Mineralstoffmischung für Rinder (Soll: 80 000 I.E. Vitamin D_3 /kg) wurde für Untersuchungszwecke so in die Vitamin D_3 -arme Basalration eingemischt, daß Prüfrationen mit einem Vitamin D_3 -Gehalt von 110 bzw. 170 I.E. (Versuch IVB1) und 150 bzw. 250 I.E./kg (Versuch IVB2) entstanden, die jeweils 4x3 Tieren angeboten wurden (Testrationen 150 und 250 I.E. Vitamin D_3 /kg: 3x3 und 1x2).

Als Meßperiode diente in Versuch IVB1 der 5.-18. und der 5.-12. Versuchstag in Versuch IVB2.

Der Futterverzehr wurde in 6-tägigen Intervallen gemessen.

3.6.2. Ergebnisse: Die Tierzahl betrug bei Testende 118 Hennen. Die Verluste lagen im Durchschnitt bei 9,2%. Sie waren sowohl auf die verschiedenen Standardkonzentrationsreihen als auch auf die unterschiedlichen Testrationen gleichmäßig verteilt (Tab. 7,8). Die Futterverzehrdaten zeigten keine rationsabhängigen Unterschiede. Steigende Vitamin D_3 -Konzentrationen im Futter blieben ohne Einfluß auf die Futteraufnahme der entsprechenden Gruppen (Tab. 7,8).

Die Abhängigkeit Eischalentrockengewicht/Tier und Tag von der Vitamin D_3 -Verabreichung im Futter wird durch die Gleichung für die Regressionsgerade ausgedrückt.

Versuch IVB1: $y = 2,02 x - 121,5 \pm 77$ (Abbildung 7)

Versuch IVB2: $y = 2,23 x - 148 \pm 79,2$ (Abbildung 8)

Die Wertbemessung durch Vergleich der Steigungen der Wirkungsgeraden war in beiden Fällen erlaubt. Mit der Standardreihe 80, 140 und 200 I.E. Vitamin D_3 /kg (Versuch IVB1) wurde für die Mineralstoffmischung (Soll: 80 000 I.E. Vitamin D_3 /kg) ein Titer von $1,17 \pm 10\%$ errechnet. Damit ergab sich ein Vitamin D_3 -Gehalt von 93 600 I.E./kg; die 95%-Vertrauensgrenzen lagen bei 74 600 und 112 700 I.E. Vitamin D_3 /kg.

Für dieselbe Probe wurde mit der Standardreihe 100, 200 und 300 I.E. Vitamin D_3 /kg (Versuch IVB2) ein Titer von $1,05 \pm 10\%$ ermittelt. Dies entspricht einem Vitamin D_3 -Gehalt von 84 000 I.E./kg Mineralfutter. Die Vertrauensgrenzen ($P < 0,05$) betrugen 66 500 und 100 700 I.E.

Die in Versuch II als mögliche Ursache für die Ungültigkeit der Wertbemessung aufgestellte Hypothese eines Vitamin D_3 -Übergehaltes bleibt in Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse ohne Stichhaltigkeit.

Tabelle 7: Ergebnisübersicht Versuch IVB1 (Meßperiode: 5.-18. Tag)

Probenmaterial: Mineralstoffmischung für Rinder

(80000 I.E. D₃/kg)

Standardrationen mit 80, 140 und 200 I.E. D₃/kg

Prüfrationen mit 110 und 170 I.E. D₃/kg

Eischalentrockengewicht/Tier und Tag

Tierverluste und Futterverzehr

Tierzahl: Versuchsbeginn 66

Versuchsende 62

	<u>Standardrationen</u>			<u>Prüfrationen</u>	
				Mineralstoff- mischung	
I.E. Vitamin D ₃ /kg Futter	80	140	200	110	170
Tierzahl	12	15	15	12	12
Wiederholungszahl	4	5	5	4	4
Verluste (%)	8	13	-	8	-
Eischalen- trockengewicht (mg/Tier u. Tag)	32	178	275	100	311
± s _{$\bar{x}$}	7,1	33,6	48,0	32,2	41,0
Futterverzehr (g/Tier und Tag)					
1.-6. Tag	18	16	16	16	16
7.-12. Tag	17	17	17	16	17
13.-18. Tag	18	20	19	18	19
Ermittelter Vitamin D ₃ -Gehalt (I.E./kg)				93 600	

Abb.: 7 Eischalentrockengewicht in Abhängigkeit von der Vitamin D₃-Konzentration im Futter (Versuch IVB1)
Standardgerade: $y = 2,02 x - 121,5 \pm 77$ ▲ —▲
Probenmaterial: Mineralfutter für Rinder
Soll: 80 000 I.E. D₃/kg ■

mg Eischale/
Tier und Tag
(5.-18. Tag)

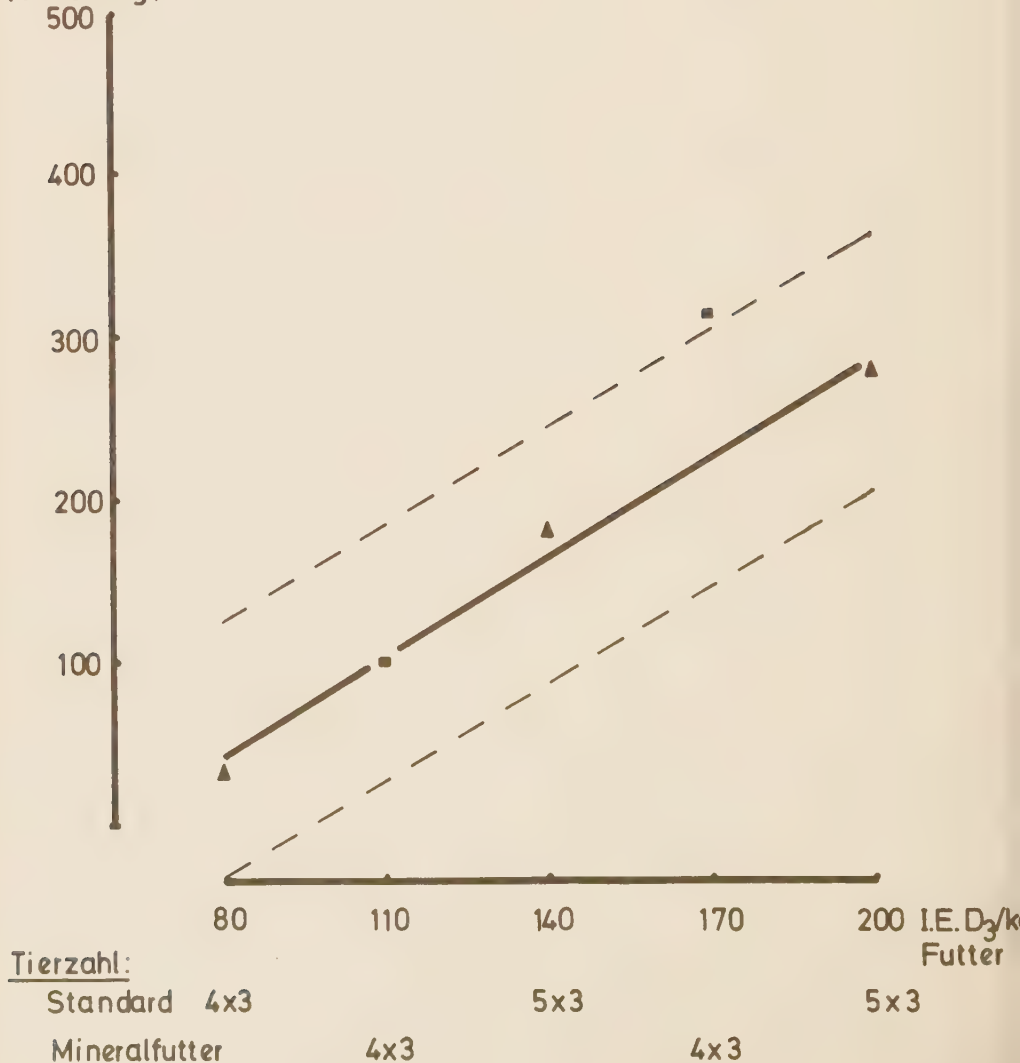


Tabelle 8: Ergebnisübersicht Versuch IVB2 (Meßperiode: 5.-12. Tag)

Probenmaterial: Mineralstoffmischung für Rinder

(80000 I.E. D_3 /kg)

Standardrationen mit 100, 200 und 300 I.E. D_3 /kg

Prüfrationen mit 150 und 250 I.E. D_3 /kg

Eischalentrockengewicht/Tier und Tag

Tierverluste und Futterverzehr

Tierzahl: Versuchsbeginn 64

Versuchsende 56

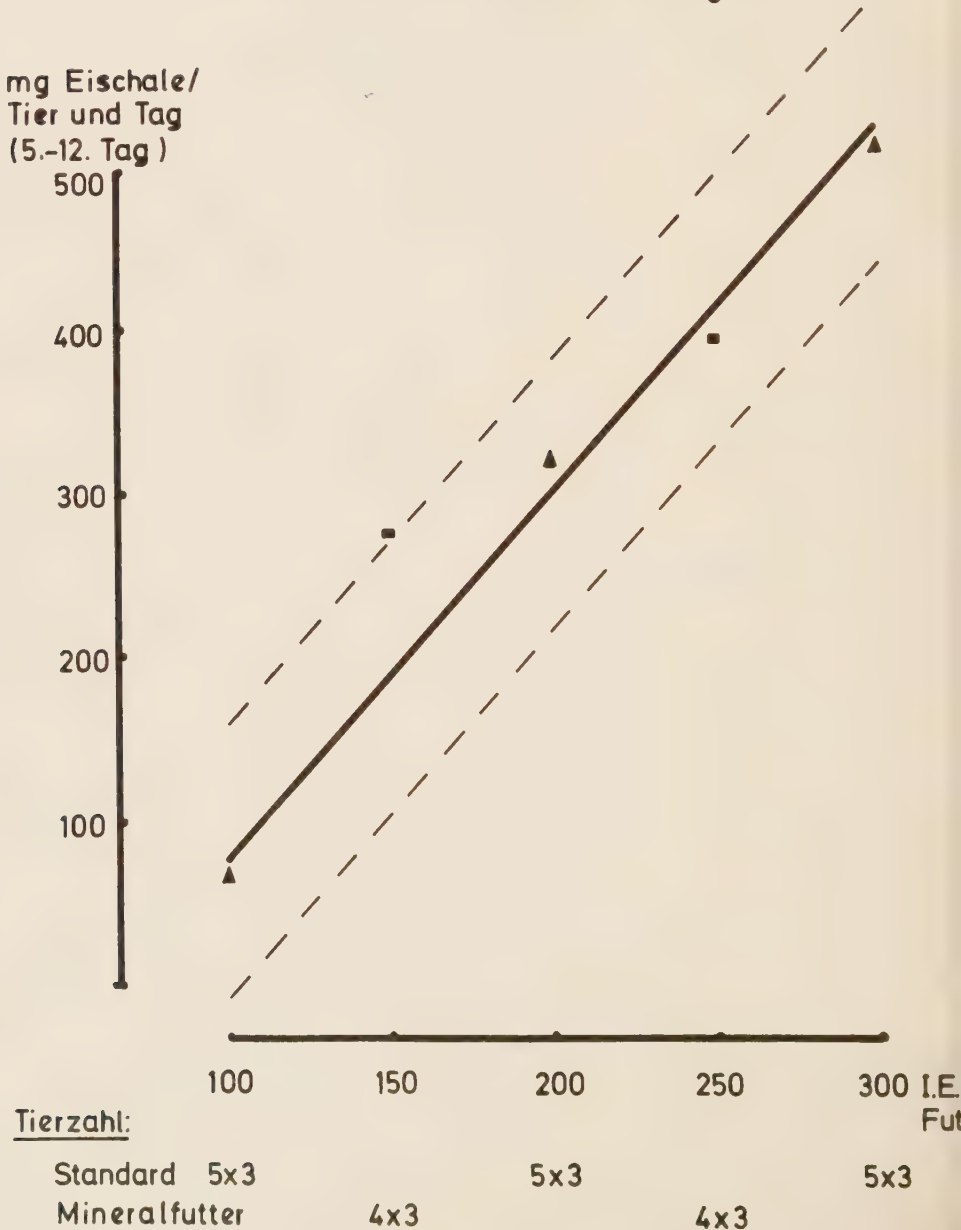
	<u>Standardrationen</u>			<u>Prüfrationen</u>	
				Mineralstoff- mischung	
I.E. Vitamin D_3 /kg Futter	100	200	300	150	250
Tierzahl	14	14	14	11	11
Wiederholungszahl	5	5	5	4	4
Verluste (%)	7	14	7	18	18

Eischalen- trockengewicht (mg/Tier u. Tag)	65	319	512	275	395
$\pm s_{\bar{x}}$	37,3	42,6	33,2	81,6	22,1

Futterverzehr (g/Tier und Tag)					
1.-6. Tag	15	17	15	17	16
7.-12. Tag	16	19	19	20	19

Ermittelter Vitamin D_3 -Gehalt (I.E./kg): 84 000

Abb.: 8 Eischalentrockengewicht in Abhängigkeit von der Vitamin D₃-Konzentration im Futter (Versuch IVB 2)
Standardgerade: $y = 2,23 x - 148 \pm 82,9$ ▲ — ▲
Probenmaterial: Mineralfutter für Rinder
Soll: 80 000 I.E. D₃/kg ■



3.7. Versuch V:

Die Durchführung von Versuch IVB2 führt bei Standardkonzentrationen mit 100, 200 und 300 I.E. Vitamin D₃/kg zu einer Verkürzung der Meßperiode vom 5.-18. auf den 5.-12. Versuchstag. Diese Modifikation würde die Handhabung des Testverfahrens wesentlich vereinfachen. Deshalb sollte die Zuverlässigkeit dieser Methode in Versuch V erneut überprüft werden.

4 verschiedene Proben, ein Legehennenmehl, ein Junghennenalleinfutter, ein Mineralfutter für Schweine und ein Ergänzungsfutter zur Energie- und Wirkstoffaufwertung von Magermilch für Kälber mit deklarierten Gehalten von 1920, 1000, 60 000 und 6 000 I.E. Vitamin D₃/kg wurden auf ihre Vitamin D₃-Konzentration untersucht.

3.7.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung:

In einer 18-tägigen Depletionszeit wurden 183 ca. 11 Wochen alte Wachtelhennen auf diesen Versuch vorbereitet. Nach dieser Zeit betrug das durchschnittliche Eischalentrockengewicht 28 mg/Tier und Tag. Durch Zusatz von 100, 200 und 300 I.E. Vitamin D₃-Standardkonzentrat/kg Basalration wurden 3 Standardrationen hergestellt. Die Wiederholungszahl/Standardration betrug 8 (Ration 100 I.E. Vitamin D₃/kg: 7).

8 Testrationen wurden je 5x3 (Testration Mineralfutter für Schweine mit 250 I.E. und Ergänzungsfutter für Kälber mit 150 I.E. Vitamin D₃/kg: 4x3) Wachtelhennen angeboten. Als Meßperiode wurde die Zeit zwischen 5. und 12. Versuchstag gewählt.

3.7.2. Ergebnisse: Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Versuchsergebnisse. Bei Versuchsende betrug die Tierzahl 177 Hennen. Die Verlustquote war mit 3,3% (gegenüber 10-15% in den vorherigen Versuchen) auffallend gering. Dies steht sicher im Zusammenhang mit dem Alter der Versuchstiere (11 Wochen) und der kurzen Versuchsdauer. Die tägliche Futteraufnahme schwankte zwischen 17 und 22 g/Tier. Es bestand kein nachweisbarer Zusammenhang zwischen Vitamin D₃-Konzentration im Futter und Futterverzehr.

Die Berechnung der Regressionsgeraden und der Streuung um die Regressionsgeraden ergab folgende Gleichung:

$$y = 1,7 x - 111 \pm 119,5 \quad (\text{Abbildung 9})$$

Tabelle 9: Ergebnisübersicht Versuch V (Meßperiode: 5.-12. Tag)

Probenmaterial: Legehennenmehl (1920 I.E. D₃/kg)

Junghennenalleinfutter (1000 I.E. D₃/kg)

Mineralfutter f. Schweine (60000 I.E. D₃/kg)

Ergänzungsfutter f. Kälber (6000 I.E. D₃/kg)

Standardrationen mit 100, 200 und 300 I.E. D₃/kg

Prüfrationen mit 150 und 250 I.E. D₃/kg

Eischalentrockengewicht/Tier und Tag

Tierverluste und Futterverzehr

Tierzahl: Versuchsbeginn 183

Versuchsende 177

	<u>Standardrationen</u>			<u>Prüfrationen</u>						
				Legehennen- mehl		Junghen- nenallein- futter		Mineral- futter		Ergän- zungsfut- ter
I.E. Vitamin D ₃ /kg Futter	100	200	300	150	250	150	250	150	250	150
Tierzahl	21	24	24	15	15	15	15	15	12	12
Wiederholungs- zahl	7	8	8	5	5	5	5	5	4	4
Verluste (%)	-	-	-	7	7	-	-	7	-	8

Eischalen- trockengewicht (mg/Tier u. Tag)	77	192	417	136	383	138	365	45	72	168
$\pm s_{\bar{x}}$	18,6	40,9	56,1	32,9	53,2	39,7	54,4	11,7	18,1	45,9

Futterverzehr (g/Tier und Tag)										
1.-6.Tag	17	19	18	19	19	18	20	17	18	17
7.-12. Tag	18	20	20	21	22	20	20	19	18	19

Ermittelte Vitamin D ₃ -Gehalte: (I.E./100g)	2 131	1 090	27 600	6 000
--	-------	-------	--------	-------

Abb.:9 Eischalentrockengewicht in Abhängigkeit von der Vitamin D₃-Konzentration im Futter (Versuch V)

Standardgerade: $y = 1,7 x - 111 \pm 119,5$ ▲——▲

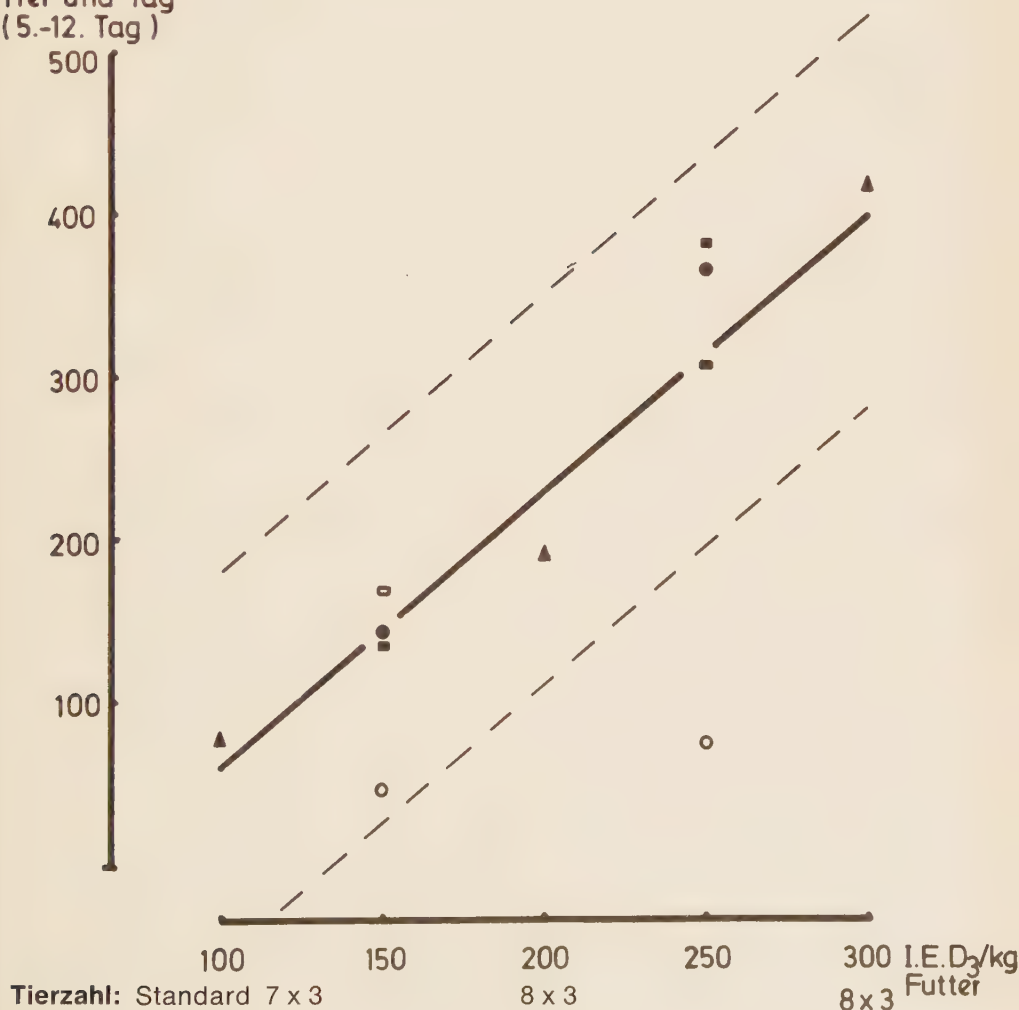
Probenmaterial: Legemehl Soll: 1920 I.E. D₃/kg ■

Junghennenalleinfutter Soll: 1000 I.E. D₃/kg ●

Ergänzungsfutter Soll: 6000 I.E. D₃/kg □

Mineralfutter Soll: 60000 I.E. D₃/kg ○

mg Eischale/
Tier und Tag
(5.-12. Tag)



Legemehl 5 x 3 5 x 3

Junghennenalleinfutter 5 x 3 5 x 3

Ergänzungsfutter 5 x 3 4 x 3

Mineralfutter 4 x 3 5 x 3

Die statistische Wertbemessung war für die in diesem Versuch untersuchten Proben erlaubt. Für die Proben Legemehl, Junghennenalleinfutter und Ergänzungsfutter zur Energie- und Wirkstoffaufwertung von Lagersmilch für Lälber ergaben sich bei Sollgehalten von 1 920, 1 000 und 6 000 I.E. Vitamin D₃/kg, Titer von $1,11 \pm 11\%$, $1,00 \pm 11\%$ und $1,01 \pm 14\%$. Die ermittelten Vitamin D₃-Konzentrationen betrugen damit für das Legemehl 2 131 I.E., die Vertrauensgrenzen ($P < 0,05$) lagen bei 1 673 und 2 602 I.E.; für das Junghennenalleinfutter wurde der Vitamin D₃-Gehalt mit 1 090 I.E. errechnet, bei Vertrauensgrenzen ($P < 0,05$) von 839 und 1 334 I.E./kg. Die entsprechenden Werte für das Ergänzungsfutter wurden mit 6 060 I.E. Vitamin D₃/kg bestimmt; die Vertrauensgrenzen ($P < 0,05$) betrugen 4 371 und 7 744 I.E. Vitamin D₃/kg. Obwohl die Gerade, die durch die Testpunkte (150 und 250 I.E. Vitamin D₃/kg) für die Probe Mineralfutter bestimmt ist, im Vergleich zur Standardgeraden eine wesentlich geringere Steigung aufweist, kann ein gemeinsamer Schnittpunkt der beiden Geraden auf der y-Achse angenommen werden; d.h. Die Wertbemessung kann auch für diese Probe als gültig angesehen werden. Die Lage der Testpunkte deutet weiter auf einen Vitamin D₃-Unter-gehalt der Untersuchungsprobe hin.

Die Berechnung des Titers für die Probe Mineralfutter für Schweine ergab einen Wert von $0,46 \pm 31\%$. Gegenüber dem deklarierten Vitamin D₃-Gehalt von 60 000 I.E./kg wurde ein Unter-gehalt ermittelt, der mit $P < 0,05$ mindestens 24% betrug. (Vertrauensgrenzen: 9 948-45 624 I.E. Vitamin D₃/kg).

Der Variationskoeffizient des Titers dieser Probe lag mit $\pm 31\%$ außerordentlich hoch, was bei der deutlichen Abweichung des festgestellten Vitamin D₃-Gehaltes von der angenommenen Vitamin D₃-Konzentration der Probe auch nicht anders zu erwarten war.

Die in einer Paralleluntersuchung im kurativen Röntgentest mit Ratten (Verfahren nach 11) ermittelten Werte für die Proben Legemehl, Junghennenalleinfutter und Mineralfutter für Schweine lagen mit 1 711, 807 und 20 778 I.E. Vitamin D₃/kg innerhalb des im Wachtelversuch bestimmten Konfidenzbereich der Vitamin D₃-Konzentration.

3.8. Versuch VI:

Wie in Versuch V sollten in diesem Versuch mit der Standardkonzentrationsreihe 100, 200 und 300 I.E. Vitamin D_3 /kg Basalration und einer Versuchsperiode vom 5.-12. Versuchstag 4 Milchnahrungsmittel für Säuglinge auf ihre Vitamin D_3 -Wirksamkeit untersucht werden. Die Proben wiesen nach der Deklaration Gehalte von 3 000, 3 220, 3 500 und 4 412 I.E. Vitamin D_3 /kg auf.

3.8.1. Tierrmaterial und Versuchsdurchführung:

189 ca. 11 Wochen alte Wachtelhennen wurden mit den Standard- und Prüfrationen gefüttert, nachdem sie vorher 18 Tage mit einer Vitamin D_3 -armen Basalration ernährt wurden. Die Ausgangsleistung der Tiere betrug bei Versuchsbeginn 56,8 mg Fischale/Tier und Tag.

Jeweils 8x3 Tiere bekamen die Standardrationen mit 100 und 200 I.E. Vitamin D_3 /kg (Dosis 300 I.E.: 7x3 Tiere). Die Testrationen (150 I.E. und 250 I.E. Vitamin D_3 /kg) wurden je 5x3 Wachtelhennen angeboten.

Für die Auswertung wurde die Periode 5.-12. Versuchstag herangezogen. Der Futterverzehr wurde am 6. und 12. Versuchstag gemessen.

3.8.2. Ergebnisse: Die Ergebnisse von Versuch VI sind in Tabelle 10 zusammengefaßt. Mit 6,3% lag die Mortalitätsrate, ähnlich wie in Versuch V (3,3%) relativ niedrig. Die Futteraufnahme pro Tier und Tag wies für die einzelnen Versuchsgruppen zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende keine Unterschiede auf.

Die Abhängigkeit Fischalentrockengewicht/Tier und Tag von der Vitamin D_3 -Aufnahme wird durch die Regressionsgerade wiedergegeben. Die Gleichung lautet:

$$y = 2,15 x - 51 \quad (\text{Abbildung 10})$$

Die Streuung um die Regressionsgerade ($s_{v,x}$) beträgt $\pm 108,8$.

Die Gültigkeitskontrolle an Hand der Varianzanalyse ergab, daß die Wertbemessung nur für die Probe mit einem Sollgehalt von 4 412 I.E. Vitamin D_3 /kg zulässig war. Es wurde ein Titer von $0,637 \pm 17\%$ ermittelt, was einem Vitamin D_3 -Gehalt von 2 96 I.E./kg entspricht. Die Vertrauensgrenzen ($P < 0,05$) betrugen 1 963 und 4 011 I.E. Vitamin D_3 /kg.

Tabelle 10: Ergebnisübersicht Versuch VI (Meßperiode: 5.-12. Tag)

Probenmaterial: 4 Milchnahrungsmittel für Säuglinge

Soll (3000 I.E. D₃/kg)

Soll (3220 I.E. D₃/kg)

Soll (3500 I.E. D₃/kg)

Soll (4412 I.E. D₃/kg)

Standardrationen mit 100, 200 und 300 I.E. D₃/kg

Prüfrationen mit 150 und 250 I.E. D₃/kg

Eischalentrockengewicht/Tier und Tag

Tierverluste und Futterverzehr

Tierzahl: Versuchsbeginn 189

Versuchsende 177

	<u>Standardrationen</u>			<u>Prüfrationen</u>							
				Soll: 3000 I.E.		Soll: 3220 I.E.		Soll: 3500 I.E.		Soll: 4412 I.E.	
I.E. Vitamin D ₃ /kg Futter	100	200	300	150	250	150	250	150	250	150	250
Tierzahl	24	24	21	15	15	15	15	15	15	15	15
Wiederholungszahl	8	8	7	5	5	5	5	5	5	5	5
Verluste (%)	4	-	10	7	7	14	14	-	-	-	-

Eischalen-trockengewicht (mg/Tier u. Tag)	123	448	546	291	375	282	590	442	473	178	301
$\pm s_{\bar{x}}$	35,9	35,5	30,4	53,4	76,2	46,6	43,2	47,5	73,0	48,6	99,7

Futterverzehr (g/Tier und Tag)											
1.-6. Tag	20	21	21	20	22	21	21	20	22	21	22
7.-12. Tag	21	22	23	22	21	21	21	20	22	21	23

Ermittelte Vitamin D ₃ -Gehalte: (I.E./kg)	(2 580	3 735	3 390)	2 969
	-	Näherungswerte	-	

Abb.:10 Eischalentrockengewicht in Abhängigkeit von der Vitamin D₃-Konzentration im Futter (Versuch VI)

Standardgerade: $y = 2,11 x - 51 \pm 108,8$ ▲——▲

Probenmaterial: 4 Milchnahrungsmittel für Säuglinge

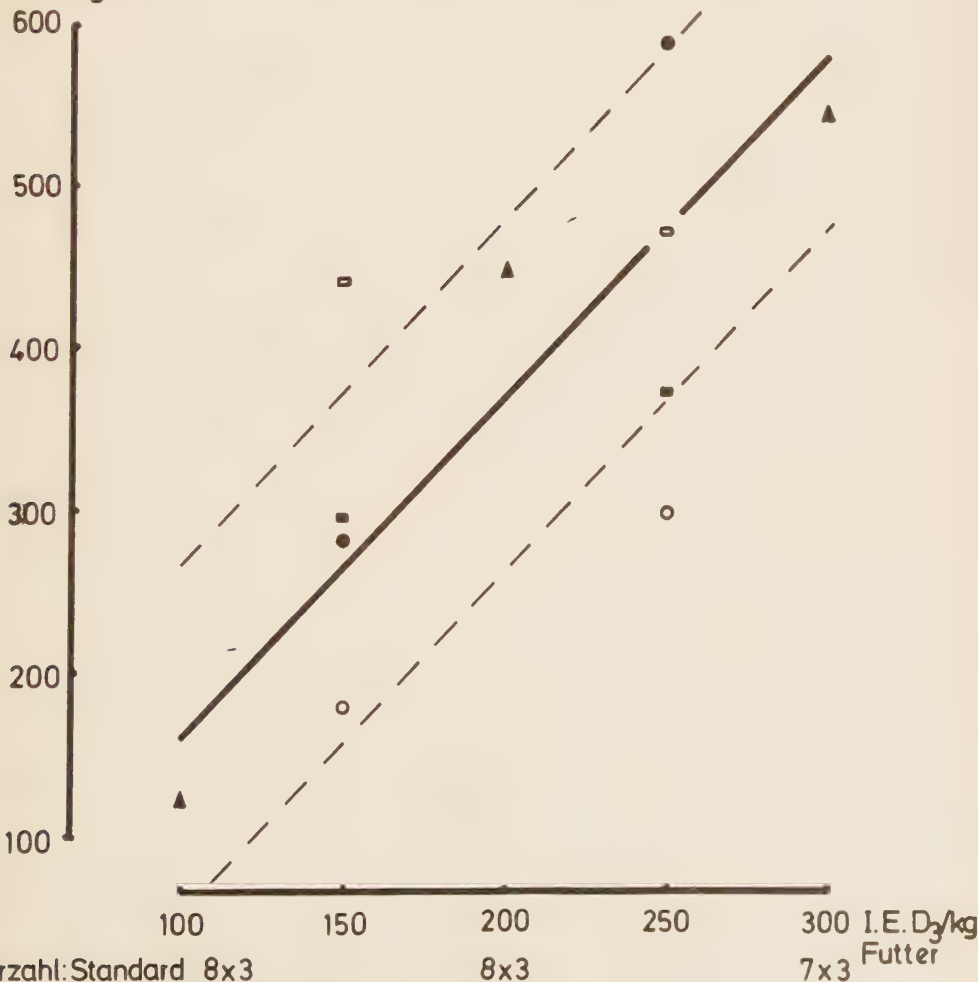
Soll: 3 000 I.E. D₃/kg ■

Soll: 3 220 I.E. D₃/kg ●

Soll: 3 500 I.E. D₃/kg ▣

Soll: 4 412 I.E. D₃/kg ○

mg Eischale/
Tier und Tag
(5.-12. Tag)



Soll: 3 000 I.E. D₃/kg 5x3 5x3

Soll: 3 220 I.E. D₃/kg 5x3 5x3

Soll: 3 500 I.E. D₃/kg 5x3 5x3

Soll: 4 412 I.E. D₃/kg 5x3 5x3

Die gleichzeitige Untersuchung der Probe im kurativen Röntgentest ergab einen Vitamin D_3 -Gehalt von 3 257 I.E./kg mit einer Standardfehler von $\pm 22\%$.

Für die restlichen untersuchten Proben war eine Wertbemessung durch Vergleich der Steigung der Wirkungsgeraden, d.h. der Geraden, die durch die Standardrationen bzw. die Prüfrationen festgelegt waren, nicht erlaubt. Aus den erhaltenen Zahlenwerten für die Titer der Proben Milchnahrungsmittel mit Sollgehalten von 3 000 I.E., 3 220 I.E. und 3 500 I.E. Vitamin D_3 /kg ergäben sich Annäherungswerte von 2 580 I.E., 3 735 I.E. bzw. 3 390 I.E. Vitamin D_3 /kg.

Als Ursachen für die Ungültigkeit der Wertbemessung müssen verschiedene Faktoren in Betracht gezogen werden. Dabei müssen solche Ursachen, die den Verlauf der Standardgeraden und solche, die die Lage der Testgeraden beeinflussen, unterschieden werden.

In Abbildung 10 fällt auf, daß die durchschnittlichen Eischalentrockengewichte für die Standardration 300 I.E. Vitamin D_3 /kg mit 546 mg/Tier und Tag im Vergleich zu 448 mg/Tier und Tag für die Ration 200 I.E. Vitamin D_3 /kg relativ niedrig liegen. Die Erhöhung der Vitamin D_3 -Konzentration im Futter von 200 auf 300 I.E./kg wurde damit nicht durch eine entsprechende Steigerung der Eischalentrockensubstanz-Ausscheidung/Tier und Tag widergespiegelt. Es ist bekannt, daß 300 I.E./kg einer bedarfsdeckenden Vitamin D_3 -Versorgung von Wachtelhennen sehr nahe kommen. (Der Bedarf wird von HOFMANN (1971) mit 320 I.E. Vitamin D_3 /kg angegeben). Die Erhöhung von Legeleistung und Eischalenstärke durch Steigerung des Vitamin D_3 -Angebots von 200 auf 300 I.E./kg lag offenbar nicht mehr im linearen Bereich der Beziehung Eischale zu Vitamin D_3 -Konzentration im Futter. Bei Vitamin D_3 -depletierten Wachtelhennen sollte aber erwartet werden dürfen, daß bei entsprechender Verkürzung der Meßperiode, innerhalb derer es dann noch nicht zu einem Auffüllen der Vitamin D_3 -Speicher kommt, auch im Bereich 100 - 300 I.E. Vitamin D_3 /kg noch eine lineare Beziehung besteht. Diese Überlegung konnte in Versuch IVB2 und V bestätigt werden. Offenbar war aber in diesem Versuch die Meßperiode (5.-12. Versuchstag) mit 7 Tagen zu kurz gewählt.

Auf Grund ihrer geringen Linearität kann die Regressionsgerade für die Standardrationen 100 - 300 I.E. Vitamin D_3 /kg als mögliche Fehlerquelle in Frage kommen.

Speziell im vorliegenden Falle muß auf einen möglichen Unsicherheitsfaktor hingewiesen werden, der sich nur auf die Testpunkte (150 I.E. und 250 I.E. Vitamin D_3 /kg) auswirkt. Da die untersuchten Milchnahrungsmittel im Durchschnitt etwa 50-60% Laktose enthielten, wurde für die Herstellung der Testrationen mit Sollgehalten 3 000, 3 220 und 3 500 I.E. Vitamin D_3 /kg, beispielsweise in die Dosis 150 I.E. Vitamin D_3 /kg ca. 2,6%, 2,4% bzw. 2,2% Laktose eingemischt. Da der Vogel nicht über das Enzym β -Galactosidase im Dünndarm verfügt, ist eine enzymatische Spaltung der Laktose in Galaktose und Glukose nicht möglich. Als Folge davon kommt es im Dickdarm zu mikrobiell ausgelösten Gärungsprozessen. Die Konzentrationserhöhung freier kurzkettiger Fettsäuren in den Ingesta führt zu Durchfall, der nach Verabreichung von Laktose an Geflügel beobachtet wird. Auch im vorliegenden Versuch VI war bei Wachteln, welche die Testrationen mit 2-3% Laktose erhielten, eine verringerte Kotkonsistenz feststellbar. Die Verdauungsstörungen beeinflussten möglicherweise die gesamte Nährstoffversorgung (Herabsetzung des Verdaulichkeitsquotienten) so, daß der Test unkontrolliert beeinflusst wurde.

3.9. Versuch VII:

Da man mit der Standardkonzentrationsreihe (100, 200 und 300 I.E. Vitamin D_3 /kg) mit der Dosis 300 I.E. möglicherweise dem Bereich der Vitamin D_3 -Bedarfsdeckung bei der Wachtelhenne zu nahe kommt, sollten in Versuch VII zwei weitere Standardreihen (80, 150 und 220 bzw. 80, 160 und 240 I.E. Vitamin D_3 /kg Wachtelfutter) bei einer Leßzeit von 11 Tagen (5.-15. Versuchstag) überprüft werden.

Mit der Standardkonzentrationsreihe 80, 150 und 220 I.E. Vitamin D_3 /kg Basalration sollte ein Milchnahrungsmittel für Säuglinge mit einem deklarierten Sollgehalt von 3 500 I.E. Vitamin D_3 /kg untersucht werden (Versuch VIIA).

Der Vitamin D_3 -Gehalt der Probe Milchnahrungsmittel (Sollgehalt: 3 000 I.E. Vitamin D_3 /kg) sollte mit der Standardreihe 80, 160 und 240 I.E. Vitamin D_3 /kg bestimmt werden (Versuch VII B). (Beide Proben wurden bereits in Versuch VI auf ihre Vitamin D_3 -Wirksamkeit untersucht; die experimentell ermittelten Eischalentrockengewichte erlaubten jedoch keine statistische Auswertung).

3.9.1. Tiermaterial und Versuchsdurchführung:

156 ca. 20 Wochen alten Legewachteln (überlebende Tiere aus Versuch V) wurden nach einer 17-tägigen Vitamin D_3 -Verarmungsperiode die Versuchsrationen angeboten. Die durchschnittliche Ausgangsleistung der Tiere betrug 39,4 mg Eischale/Tier und Tag.

In Versuch VII A erhielten 4x3 Tiere die Ration mit 80 I.E. und 6x3 Hennen die Probe mit 150 I.E. Vitamin D_3 /kg. 5x3 Wachtelhennen wurden mit einer Standardration gefüttert, die einen Vitamin D_3 -Gehalt von 220 I.E./kg aufwies. Die Zahl der Wiederholungen (zu je 3 Tieren) betrug für die Testration 115 I.E. 5, für die Testration 185 I.E. Vitamin D_3 /kg 6.

In Versuch VII B bekamen je 6x3 Wachtelhennen die Standardrationen mit einer Vitamin D_3 -Konzentration von 80 und 240 I.E./kg angeboten (Standardration 160 I.E. Vitamin D_3 /kg: 5x3 Tiere). Die Testration 120 I.E. erhielten 6x3 Hennen und die Testration 200 I.E. Vitamin D_3 /kg 3x3 Tiere.

Als Meßperiode für die Eischalentrockengewichtsbestimmung diente die Zeit zwischen 5. und 15. Versuchstag. Der Futterverzehr wurde nach 7 und 15 Versuchstagen gemessen.

3.9.2. Ergebnisse: Über Ergebnisse aus Versuch VII A und VII B orientieren die Tabellen 11 bzw. 12. Die Tierverluste (7 von 156 Hennen) verhielten sich unabhängig vom Vitamin D_3 -Gehalt der angebotenen Futterrationen. Mit 4,5% lag die Mortalitätsrate nach 15-tägiger Versuchsdauer niedriger als in den Versuchen I-III (10-15%). Auch ließen die Futterverzehrdaten keine Relation zwischen Vitamin D_3 -Angebot im Futter und der täglichen Futteraufnahme erkennen. Dagegen war eine steigende Futteraufnahme im Verlaufe der Untersuchung zu beobachten.

Tabelle 11: Ergebnisübersicht Versuch VIIA (Meßperiode: 5.-15. Tag)

Probenmaterial: Milchnahrungsmittel für Säuglinge

Soll (3500 I.E. D₃/kg)

Standardrationen mit 80, 150 und 220 I.E. D₃/kg

Prüfrationen mit 115 und 185 I.E. D₃/kg

Eischalentreckengewicht/Tier und Tag

Tierverluste und Futterverzehr

Tierzah: Versuchsbeginn 78

Versuchsende 75

	<u>Standardrationen</u>			<u>Prüfrationen</u>	
				Soll: 3 500 I.E.	
I.E. Vitamin D ₃ /kg Futter	80	150	220	115	185
Tierzah	12	18	15	15	18
Wiederholungs- zahl	4	6	5	5	6
Verluste (%)	8	-	-	-	12

Eischalentrecken- gewicht	51	261	390	101	373
(mg/Tier und Tag)					
$\pm s_{\bar{x}}$	20,2	27,8	61,8	35,1	61

Futterverzehr (g/Tier und Tag)					
1.-7. Tag	19	19	19	20	20
8.-15. Tag	21	21	23	21	23

In den ersten 7 Versuchstagen nahmen die Wachtelhennen im Durchschnitt 18 g Futter/Tier und Tag auf. In der 2. Versuchshälfte (8.-15. Versuchstag) stieg die Verzehrslrate auf durchschnittlich 20 g Futter/Tier und Tag an (Mittel aus beiden Versuchen). Wie in den vorangegangenen Untersuchungen wurde in diesem Versuch die Eischalencalciumausscheidung der Wachtelhennen durch steigende Vitamin D₃-Gaben positiv beeinflusst. Als Gleichungen für die Regressionsgeraden ergaben sich:

Versuch VIIA: $y = 2,42 x - 120 \pm 92,1$ (Abbildung 11)

Versuch VIIB: $y = 2,24 x - 97 \pm 142,2$ (Abbildung 12)

Abb.:11 Eischalentrockengewicht in Abhängigkeit von der Vitamin D₃-Konzentration im Futter (Versuch VII A)
 Standardgerade: $y = 2,42 x - 129 \pm 92,1$ ▲——▲
 Probenmaterial: Milchnahrungsmittel für Säuglinge
 Soll: 3 500 I.E.D₃/kg ■

mg Eischale/
 Tier und Tag
 (5.-15. Tag)

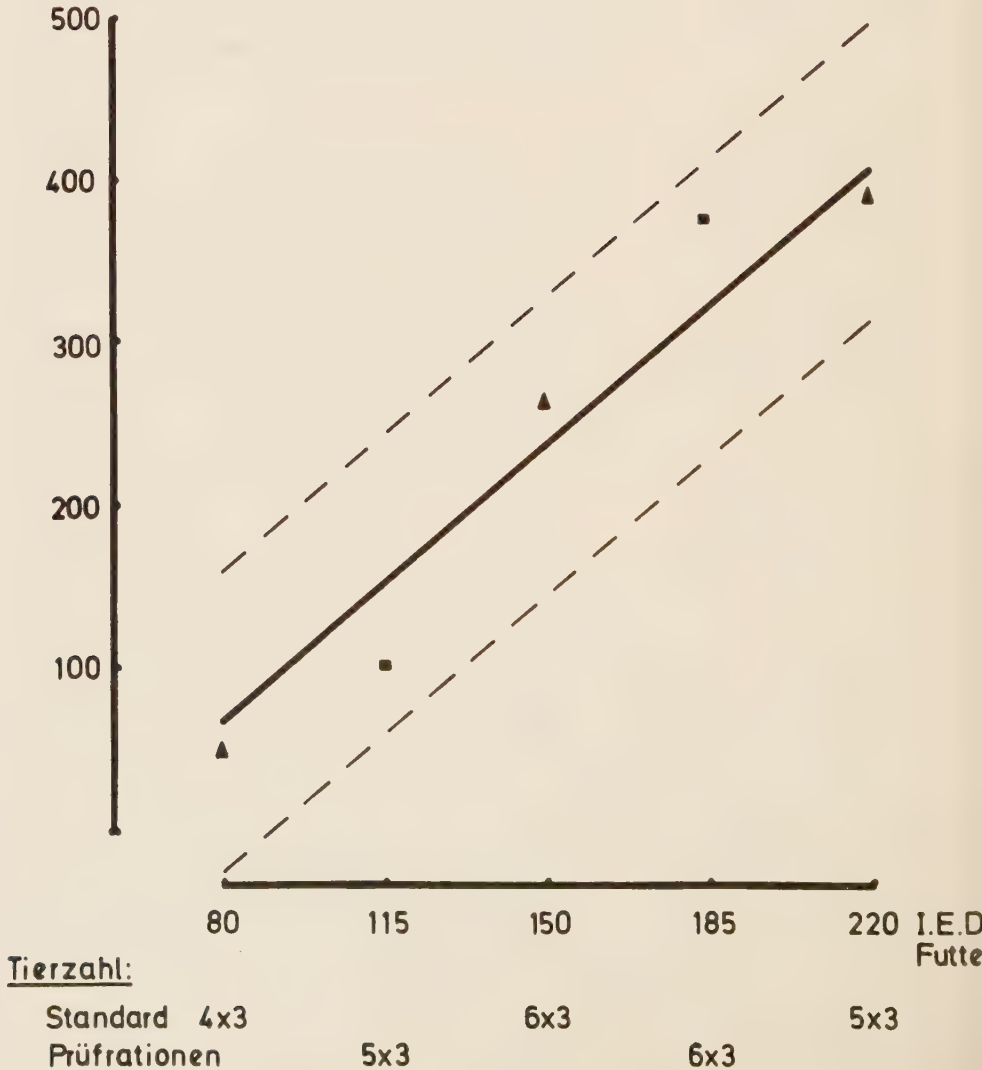


Tabelle 12: Ergebnisübersicht Versuch VIIR (Meßperiode: 5.-15. Tag)

Probenmaterial: Milchnahrungsmittel für Säuglinge

Soll (3 000 I.E. D₃/kg)

Standardrationen mit 80, 160 und 240 I.E. D₃/kg)

Prüfrationen mit 120 und 200 I.E. D₃/kg

Eischalentrockengewicht/Tier und Tag

Tierverluste und Futterverzehr

Tierzahl: Versuchsbeginn 78

Versuchsende 74

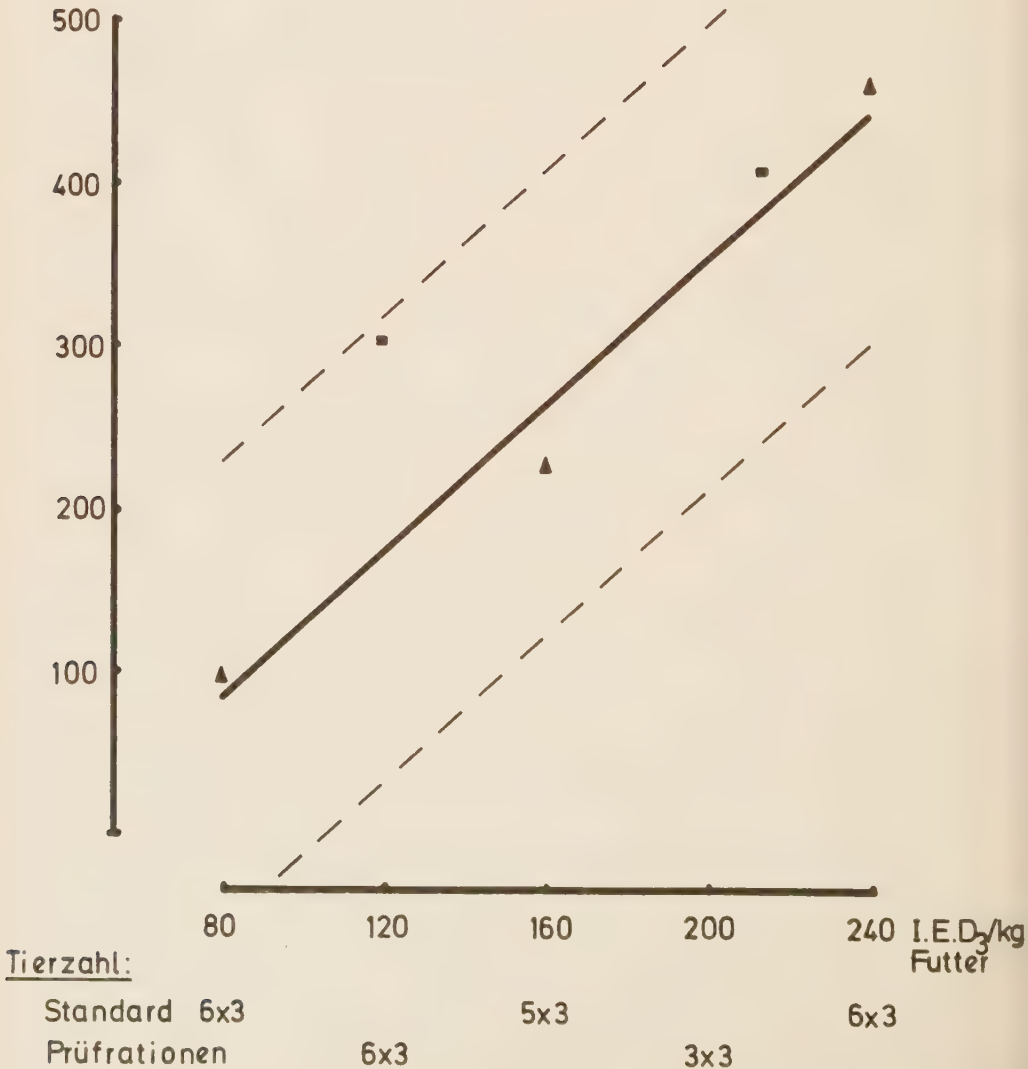
	<u>Standardrationen</u>			<u>Prüfrationen</u>	
				Soll: 3 000 I.E.	
I.E. Vitamin D ₃ /kg Futter	80	160	240	120	200
Tierzahl	18	15	18	18	9
Wiederholungszahl	6	5	6	6	3
Verluste (%)	6	7	12	-	-
Eischalentrockengewicht (mg/Tier und Tag)	99	226	458	304	407
$\pm s_{\bar{x}}$	24,3	41,7	89,7	46,5	132,6
Futterverzehr (g/Tier und Tag)					
1.-7. Tag	17	16	16	15	18
8.-15. Tag	19	18	18	18	19

Für die Standardkonzentrationsreihe 80, 160 und 240 I.E. Vitamin D₃/kg ergab die Streuung um die Regressionsgerade mit $\pm 142,2$ den höchsten bisher beobachteten Wert.

Die Wertbemessung war für beide untersuchten Proben zulässig. Für die Probe mit dem Sollgehalt 3 500 I.E. Vitamin D₃/kg wurde ein Titer von $1,05 \pm 9\%$ errechnet; (Die "statistisch nicht zulässige" Schätzung des Titers derselben Probe in Versuch VI hatte einen Wert von 1,14 ergeben). Der Vitamin D₃-Gehalt lag damit 3675 I.E./kg. Bei 5%-Irrtumswahrscheinlichkeit enthielt die Probe zwischen 2 940 und 4 375 I.E. Vitamin D₃/kg. Der entsprechende Wert für den Titer der Probe (Soll: 3 000 I.E. Vitamin D₃/kg) ergab sich mit $1,28 \pm 16\%$. Die errechnete Vitamin D₃-Konzentration lag bei 3 840 I.E./kg. Die Vertrauensgrenzen ($P < 0,05$) betrugen 2 520 und 5 160 I.E. Vitamin D₃/kg.

Abb.:12 Eischalentrockengewicht in Abhängigkeit von der Vitamin D₃-Konzentration im Futter (Versuch IB)
 Standardgerade: $y = 2,24 x - 97 \pm 142,2$ ▲ ——— ▲
 Probenmaterial: Milchnahrungsmittel für Säuglinge
 Soll: 3 000 I.E. D₃/kg ■

mg Eischale/
 Tier und Tag
 (5.-15. Tag)



4.1. Vergleich verschiedener Standardkurven:

In den Versuchen I, II, III und IVB1 wurde der Vitamin D₃-Standard so in die Vitamin D₃-arme Basalration (Tab.2) eingemischt, daß Standardrationen mit einem Vitamin D₃-Gehalt von 80, 140 und 200 I.E./kg entstanden. (Die korrespondierenden Testrationen wiesen eine Konzentration von 100 und 170 I.E. Vitamin D₃/kg auf). Die Versuchsmethodik blieb in den 4 genannten Versuchen gleich.

Auf Grund der Übereinstimmung in den Dosierungen der Standardrationen und den Versuchsperioden (5.-18. Tag) ist ein Vergleich der einzelnen Standardkonzentrationsreihen miteinander erlaubt. In allen 4 Versuchen bestand eine direkte lineare Beziehung zwischen Vitamin D₃-Konzentration im Futter und Eischalentrockengewicht/Tier und Tag. Diese Korrelation wurde in einem Koordinatensystem graphisch dargestellt. Getrennt nach den einzelnen Versuchen wurden die Regressionsgeraden berechnet und in Abbildung 13 wiedergegeben.

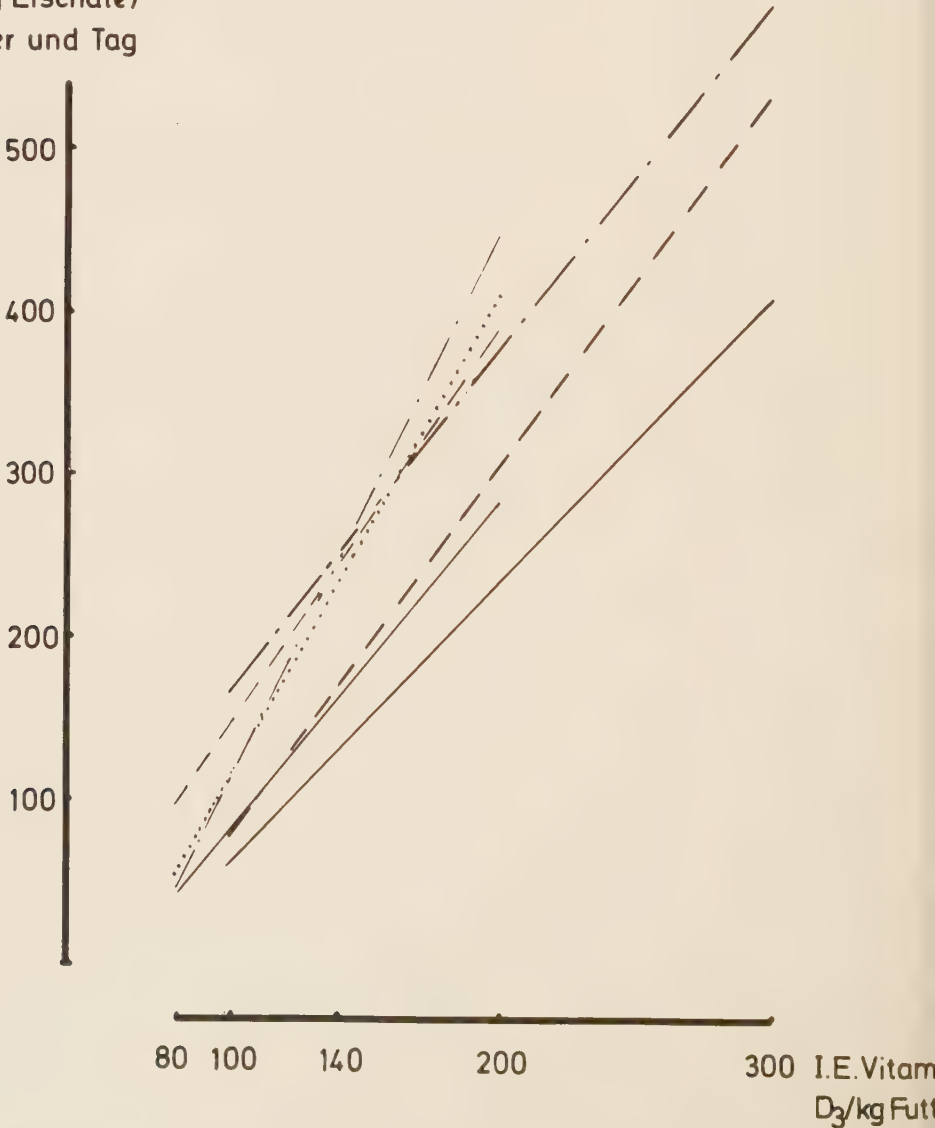
Der Regressionskoeffizient betrug in Versuch I: 3,37; in Versuch II: 2,96; in Versuch III: 2,45 und in Versuch IVB1: 2,02. Durch Verwendung des Standardschätzfehlers ($s_{y,x}$) für die einzelnen Standardkonzentrationsreihen erhielten wir ein weiteres Kriterium für die Beurteilung der Standardgeraden bzw. der erreichbaren Meßgenauigkeit. Die errechneten Werte für den Standardfehler der Regressionsschätzung ($\pm s_{y,x}$) lagen für die Versuche I, II, III bzw. IVB1 bei 90,3, 104,2, 110 bzw. 77.

Die gleichen Parameter wurden auch für die Regressionsgeraden der Versuche IVB2, V und VI bestimmt, da in diesen Versuchen wiederum einheitlich Standardkonzentrationsreihen mit 100, 200 und 300 I.E. Vitamin D₃/kg angewandt wurden bei ebenfalls gleicher Dauer des Meßzeitraumes (5.-12. Versuchstag). Die ermittelten Regressionsgeraden sind gleichfalls in Abbildung 13 wiedergegeben. Die Werte für die Steigungskoeffizienten lagen bei 2,23 in Versuch IVB2, bei 1,7 in Versuch V und bei 2,11 in Versuch VI. Für den Standardschätzfehler ergaben sich Werte ($\pm s_{y,x}$) von 82,9, 119,5 bzw. 108,8 für die Versuche IVB2, V bzw. VI.

Abb.: 13 Vergleich der sich aus den Standardkonzentrationsreihen der Versuche I-VI ergebenden Regressionsgeraden

- | | | |
|---------|------------------------------------|----------------------------------|
| — · — · | Versuch I: $y = 3,37 x - 223,8$ | Versuch IVB2: $y = 2,23 x - 148$ |
| | Versuch II: $y = 2,96 x - 182,2$ | Versuch V: $y = 1,7 x - 111$ |
| - - - - | Versuch III: $y = 2,45 x - 99$ | Versuch VI: $y = 2,11 x - 51$ |
| ———— | Versuch IVB1: $y = 2,02 x - 121,5$ | |

mg Eischale/
Tier und Tag



Die einzelnen Regressionsgeraden wiesen damit für beide Konzentrationsreihen (80, 140 und 200 bzw. 100, 200 und 300 I.E. Vitamin D_3 /kg) unterschiedliche Steigungen auf. Als Gründe dafür müssen das unterschiedliche Tiermaterial (4 Kollektive in 7 Versuchen), das verschiedene Alter der Versuchstiere (11-32 Wochen) sowie der ungleiche Depletionsstand der Wachtelhennen bei Versuchsbeginn (11,9-56,8 mg Eischale/Tier und Tag) angesehen werden.

Inwieweit der Depletionsstand (= Ausgangsleistung bei Versuchsbeginn) sowohl die Steigung der einzelnen Regressionsgeraden wie auch deren Lage und damit ihren Schnittpunkt mit der Ordinate beeinflusst, kann an einem Zahlenbeispiel verdeutlicht werden. In Versuch I mit einer Ausgangsleistung von 11,9 mg Eischale/Tier und Tag lag der Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse (Vitamin D_3 -Zufuhr = 0 I.E./kg Futter) bei -234 mg Eischale/Tier und Tag. In Versuch III war die Ausgangsleistung der Tiere gegenüber Versuch I mit 32 mg Schale/Tier und Tag fast um den Faktor 3 erhöht. Der Schnittpunkt mit der Ordinate ergab einen Wert von -183 mg Eischale/Tier und Tag. Bei einer Ausgangsleistung von 108 mg Schale/Tier und Tag (Versuch IVA) lag der korrespondierende Wert bei -33 mg Eischale. Als theoretisch richtiger Wert für den Schnittpunkt der Ordinate mit der Regressionsgeraden dürfte ein kleinerer Wert als 0 nicht erwartet werden. Daraus geht zumindest hervor, daß die Beziehung Eischalentrockensubstanz zu Vitamin D_3 im Bereich kleiner als 80 I.E. Vitamin D_3 /kg keiner linearen Funktion folgt. Weiter läßt sich folgern, daß die Lage der Regressionsgeraden durch die unterschiedlich weit vorangetriebene Depletion beeinflusst wird. Aus dieser Abhängigkeit resultiert aber nicht eine Parallelverschiebung der jeweiligen Standardgeraden, vielmehr wird der Steigungskoeffizient der Regressionsgeraden ebenfalls durch das Ausmaß der Eischalenausscheidung bei Versuchsbeginn beeinflusst. So ergab sich bei einer Ausgangsleistung von 11,9 mg Eischale/Tier und Tag ein Steigungskoeffizient von 3,37, bei 32 bzw. 108 mg Eischale/Tier und Tag ein solcher von 2,45 bzw. 1,18. Daraus geht hervor, daß eine möglichst weitgehende Vitamin D_3 -Verarmung vor Testbeginn eine besonders starke Steigung der Regressionsgeraden zur Folge hat.

Da die Testgenauigkeit mit zunehmendem Steigungskoeffizienten in der Regel ebenfalls anwächst, ist zur Durchführung der Vitamin D₃-Bestimmung im Wachteltest eine deutlich ausgeprägte Depletion (≤ 40 mg Eischale/Tier und Tag) anzustreben.

Die unterschiedlichen Regressionskoeffizienten sind ein sehr anschaulicher Beweis für die Erfahrung, daß im biologischen Testverfahren für Wiederholungsexperimente mit gleichen Standardrationen, im Gegensatz zu chemischen Bestimmungsverfahren keine deckungsgleichen Standardkurven bzw. Regressionsgeraden (Eichkurven) erwartet werden dürfen. Deshalb kann bei der Durchführung eines biologischen Bestimmungsverfahrens auch nicht auf die Mitführung von mehreren Standardkonzentrationen (mindestens 2, besser 3) verzichtet werden. Dadurch werden Test- und Standardpräparat in gleicher Weise auf die jeweilige Reaktionslage bezogen. Schließlich muß auch, wie bei allen biologischen Testmethoden mit einer in relativ kurzer Zeit schwankenden Reaktionsfähigkeit des tierischen Organismus gerechnet werden. Es ist daher möglich, daß trotz Einhaltung derselben Versuchsbedingungen die Empfindlichkeit des Versuchstieres gegenüber Vitamin D₃ variiert.

4.2. Vergleich verschiedener Standarddosierungen und Versuchsperioden:

Es wurden insgesamt 5 verschiedene Standardkonzentrationsreihen mit entsprechender Änderung der Versuchsperiode verwendet. Damit sollte geprüft werden, inwieweit die Meßgenauigkeit durch Verwendung anderer Standardreihen und Meßperioden beeinflusst wird. Als Kriterien dienten der Standardfehler der Regressionsschätzung ($\pm s_{y.x}$) sowie der Streubereich, welcher alle Regressionsgeraden mit den gleichen Vitamin D₃-Konzentrationsreihen zusammen erfaßt.

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die verschiedenen Standarddosierungsreihen und deren Parameter. In der Übersicht sind jeweils die Versuche mit den gleichen Standarddosierungen und Versuchsperioden zusammen dargestellt.

Tabelle 13: Standardkonzentrationsreihen, Wiederholungszahl/Standardration, Meßperioden, Gleichung der Regressionsgeraden sowie Standardfehler der Regressionsschätzung.

Standardkonzentrationsreihe I.E. Vitamin D ₃ /kg Futter)	Meßperiode	Versuch	Wiederholungen Standard	Regressionsgerade	s _{y.x}
80 - 140 - 200	5.-18. Tag	I	3x8	y=3,37x-223,8	± 90,3
		II	3x7	y=2,96x-182,2	± 104,2
		III	3x6	y=2,45x- 99	± 110
		IVB1	3x5	y=2,02x-121,5	± 77
		Ø		y=2,7 x-157	± 102
100 - 200 - 300	5.-12. Tag	IVB2	3x5	y=2,23x-148	± 79,2
		V	3x8	y=1,7 x-111	± 119,5
		VI	3x8	y=2,11x- 51	± 106,8
		Ø		y=2,02x-104	± 124

Bei einem Vergleich des Standardschätzfehlers ($\pm s_{y.x}$) für die Standardkonzentrationsreihen (80, 140 und 200 bzw. 100, 200 und 300 I.E. Vitamin D₃/kg) fällt auf, daß die Werte in einem Bereich zwischen 77 (Versuch IVB1) und 119,5 (Versuch V) liegen. Ein Zusammenhang zwischen der Zahl der Wiederholungen für die einzelnen Standardrationen und dem Standardfehler der Regressionsschätzung ist nicht erkennbar (bei 5 Wiederholungen betrug s_{y.x} 77, bei 8 lag der Wert bei 119,5). Während in Normalfall erwartet werden muß, daß mit Erhöhung der Wiederholungszahl eine Erniedrigung des Standardschätzfehlers und damit eine Steigerung der Meßgenauigkeit verbunden ist, konnte dies im vorliegenden Fall nicht festgestellt werden.

Daraus könnte geschlossen werden, daß die Unterschiede in den gewählten Wiederholungszahlen (mindestens 4×3 , maximal 8×3) zu klein waren. An Hand des Standardschätzfehlers für die verschiedenen Standardreihen der Einzelversuche kann kein sicheres Urteil über die Brauchbarkeit bzw. Genauigkeit der einzelnen Modifikationen gefällt werden.

Für die Versuche I-IVB1 bzw. IVB2-VI, die mit einheitlicher Standardreihe und gleicher Meßperiode durchgeführt wurden, wurde deshalb für die einzelnen Regressionsgeraden eine "mittlere" Regressionslinie und der zugehörige Schätzfehler angegeben. Sie folgte der Gleichung $y = 2,7 x - 157 \pm 102$ für die Standardreihe 80, 140 und 200 I.E. bzw. $y = 2,02 x - 104 \pm 124$ für die Standarddosierungsreihe 100, 200 und 300 I.E. Vitamin D_3/kg (Abbildung 14).

2 Parallelen zur Regressionsgeraden im Abstand von $2s_{y,x}$ bilden ein Band, das 95% aller ermittelten Eischalentrockengewichte für die Standardreihen enthält. Für die Standardkonzentrationsreihe 80, 140 und 200 I.E. Vitamin D_3/kg liegt $s_{y,x}$ bei ± 102 . Der begrenzte Bereich für die Standardreihe 100, 200 und 300 I.E. Vitamin D_3/kg ist mit $s_{y,x} = \pm 124$ entsprechend größer. Es kann daher angenommen werden, daß unter Verwendung der Standardrationen 80, 140 und 200 I.E. Vitamin D_3/kg und einer Meßperiode vom 5.-18. Versuchstag eine höhere Meßgenauigkeit erzielt werden kann, da die Variabilitätsursachen sich hier in geringerem Maße auswirken.

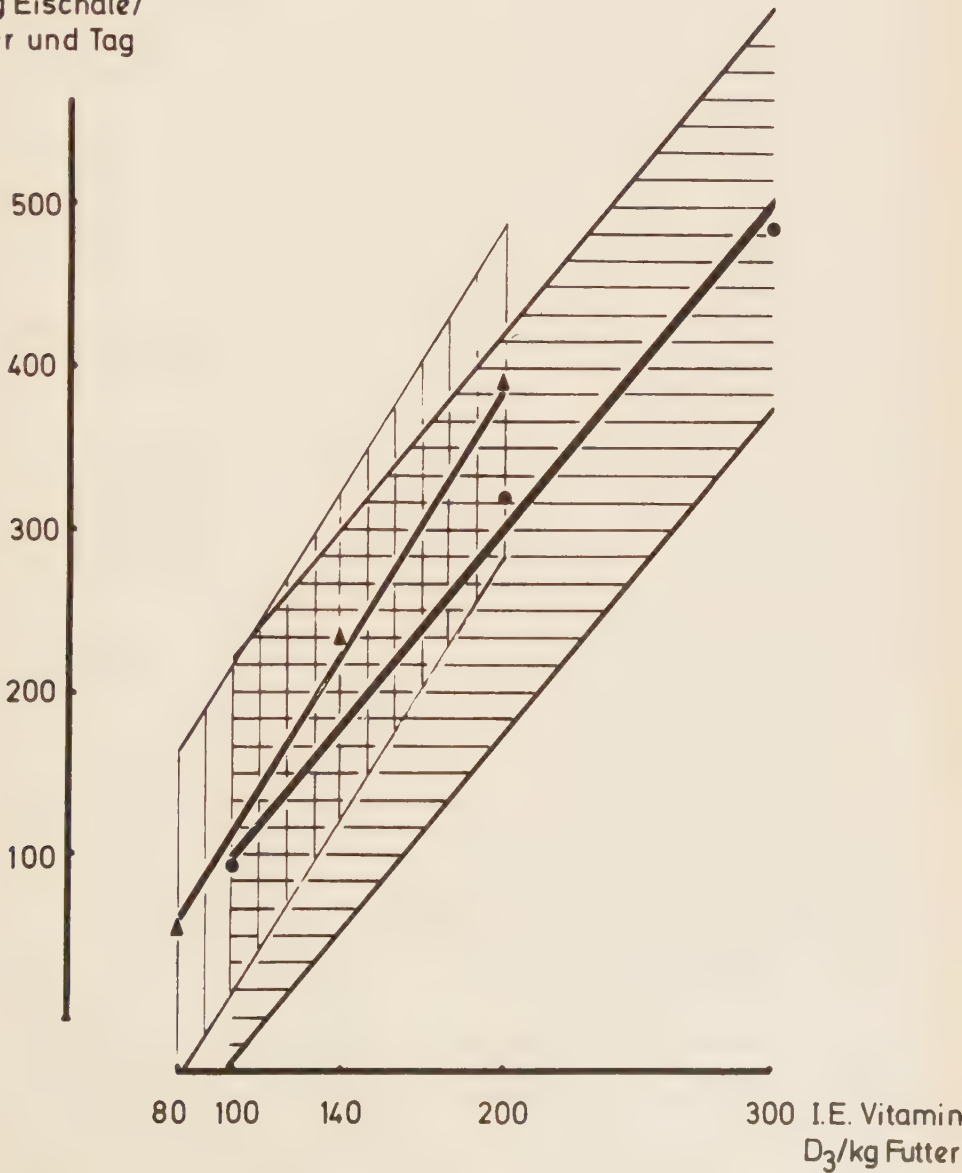
Der höhere Standardschätzfehler der gemittelten Regressionsgeraden für die Standardreihe 100, 200 und 300 I.E. Vitamin D_3/kg steht möglicherweise im Zusammenhang mit der schon in Versuch VI beobachteten geringeren Linearität der Regressionsgeraden, die auch aus den gemittelten Werten noch deutlich ersichtlich ist. Da bei der Wachtelhenne der Vitamin D_3 -Bedarf mit 320 I.E. Vitamin D_3/kg Futter als gedeckt gelten kann, liegt die höchste Vitamin D_3 -Dosis bei Verwendung der Standardreihe 100-300 I.E. Vitamin D_3/kg vermutlich in einem Konzentrationsbereich, in dem die Eischalenverkalkung der Tiere nicht mehr proportional zur Erhöhung der Vitamin D_3 -Konzentration zunimmt.

Abb.: 14 Vergleich der aus den Versuchen I-IVB1 bzw. IVB2 - VI bestimmten "mittleren" Regressionsgeraden

Versuche I-IVB1: $y = 2,7 x - 157 \pm 102$ ▲ ——— ▲

Versuche IVB2-VI: $y = 2,02 x - 104 \pm 124$ ● ——— ●

mg Eischale/
Tier und Tag



Es muß daher angenommen werden, daß nach Verabreichung einer Dosis von 300 I.E. Vitamin D_3 /kg die Wachteln in kurzer Zeit mit der entsprechenden Eischalencalciumausscheidung reagieren und die Vitamin D_3 -Depots relativ schnell aufgefüllt werden. Es wurde deshalb versucht der Bildung von Vitamin D_3 -Speichern als Einflußgröße auf das Meßergebnis, durch eine Verkürzung der Meßperiode von 5.-18. auf 5.-12. Versuchstag entgegenzuwirken. Diese Maßnahme erwies sich aber offensichtlich als unzureichend, eine brauchbare Linearität der Regressionsgeraden (für die Standardration 100, 200 und 300 I.E. Vitamin D_3 /kg) zu bewirken. Der hohe Standardfehler der Regressions-schätzung für diese Standardkonzentrationsreihe (± 124) unterstreicht diese Feststellung.

Ein großer Standardfehler der Regressionsschätzung erhöht fraglos die Anzahl nicht gültiger Wertberechnungen, da zusätzlich noch eine Eigenstreuung der Probentestergebnisse, die ihrerseits mit dem Standardfehler der Regressionsgeraden positiv korreliert sein dürfte, in die Auswertung eingeht.

Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen kann gefolgert werden, daß die Standardkonzentrationsreihe 80, 140 und 200 I.E. Vitamin D_3 /kg mit einer Meßperiode von 5. bis 18. Versuchstag, eher in den linearen Bereich der Beziehung zwischen Eischalenausscheidung und Vitamin D_3 -Angebot fällt. Bei Anwendung dieser Standardreihe ist daher im Vergleich zu der Reihe 100-300 I.E. Vitamin D_3 /kg, mit einer größeren Testgenauigkeit zu rechnen. Auch schienen die Ergebnisse mit Standardrationen von 80, 140 und 200 I.E. Vitamin D_3 /kg nur in geringem Maße vom Grad der Vitamin D_3 -Verarmung der Wachtelhenne bei Versuchsbeginn abhängig zu sein. Weiter kann zugunsten dieser Konzentrationsreihe angeführt werden, daß der Steigungskoeffizient der korrespondierenden Regressionsgeraden mit durchschnittlich 2,7 wesentlich höher liegt, als der entsprechende Wert der Dosisreihe 100, 200 und 300 I.E. Vitamin D_3 /kg mit 2,02. Die dadurch ausgewiesene höhere Empfindlichkeit des Testkriteriums Eischalentrochengewichtsausscheidung/Tier und Tag läßt erwarten, daß selbst geringe Unterschiede in der Vitamin D_3 -Versorgung zuverlässig gemessen werden können.

Da die restlichen Standardkonzentrationsreihen (140, 200 und 260; 80, 150 und 220; 80, 160 und 240 I.E. Vitamin D₃/lg) bzw. Versuchsperioden (3.-12. Tag bzw. 5.-15. Tag) nur jeweils in einer Untersuchung geprüft wurden, ist es nicht möglich ein Urteil über ihre Brauchbarkeit bzw. Zuverlässigkeit zu bilden.

4.3. Fehlerquellen der Vitamin D₃-Bestimmung:

Als Hauptvoraussetzung für das Gelingen des Vitamin D₃-Bestimmungsverfahrens muß das Vorliegen einer homogenen Vitamin D₃-Verteilung in den Standard- und Probenrationen angenommen werden, da Rationen mit einem absolut geringen Vitamin D₃-Gehalt (80-300 I.E./lg) angeboten werden. Berücksichtigt man noch den mit ca. 20 g/Tier und Tag absolut geringen Futterverzehr der Wachtel, dann entspricht eine Konzentration von 80 I.E. Vitamin D₃/lg Futter einer täglichen Aufnahme von 1,6 I.E./Wachtelhenne.

Das als Vitamin D₃-Standardpräparat verwendete Konzentrat trug diesen Bedingungen weitgehend Rechnung. Bei einer Vitamin D₃-Konzentration von 4 040 I.E./g Konzentrat, lag die mittlere Partikelbeladung bei 0,3 I.E. Daraus ergibt sich, daß mindestens 5 Partikel Vitamin D₃-Konzentrat in 20 g Futter enthalten sein müssen, um rechnerisch eine über den Versuchszeitraum kontinuierlich erfolgende Vitamin D₃-Versorgung der Wachtelhenne, die der Vitamin D₃-Konzentration im Futter entspricht, sicherzustellen.

In der Praxis finden jedoch unter anderem Vitamin D₃-Präparationen mit 400 000 I.E./g Verwendung. Die mittlere Partikelbeladung kann hier einen Wert von maximal 1 I.E. Vitamin D₃ erreichen (abhängig von Partikelgröße und deren Verteilung). Um die Forderung nach einer quantitativ kontinuierlichen Vitamin D₃-Zufuhr zu erfüllen, müßten unter Zugrundelegung der maximalen Partikelbeladung von 1 I.E. Vitamin D₃ in 20 g Tagesration 1,6 Partikel enthalten sein. Dieses Postulat dürfte aber insbesondere unter Berücksichtigung mischtechnischer Gegebenheiten nicht erfüllt werden.

Wenn daher - unter Einbeziehung einer Testration mit 110 I.E. Vitamin D₃/kg - die tägliche Vitamin D₃-Aufnahme um mindestens $\pm 100\%$ vom Sollwert (2,2 I.E. Vitamin D₃/Tag) abweicht, was in etwa einer Spannweite von 0-2 Vitamin D₃-Partikel in 20 g Futter entspricht, müssen auch Schwankungen in der täglichen Legeleistung erwartet werden, die zufallsbedingt den Versuchsmittelwert zu beeinflussen vermögen.

Ähnliche Verhältnisse haben möglicherweise auch bei der Untersuchung von Mineralfutter für Rinder (Soll: 80 000 I.E. Vitamin D₃/kg) in Versuch II vorgelegen. Die unterschiedliche Größe von Mineral- und Vitamin D₃-Konzentrat-Partikel hat eventuell eine nicht völlig homogene Untermischung von Vitamin D₃ im Mineralfutter zur Folge, die für die Frage der Vitamin D₃-Versorgung von Rindern bei Tagesgaben von 100-150 g Mineralfutter, ohne Belang ist. Wenn dagegen nur 1,35 g Mineralfutter in 1 kg Wachtelfutter eingemischt werden, spielt dieser Faktor eine entscheidende Rolle für die Feinverteilung von Vitamin D₃ im Wachtelfutter. Auch Probennahmefehler (z.B. aus dem Mineralfutter) wirken sich hier besonders deutlich aus und beeinträchtigen die Testgenauigkeit.

Ganz anders stellen sich die Probleme bei Vorliegen von relativ geringen Vitamin D₃-Konzentrationen in den zur Untersuchung anstehenden Proben dar. Bei Vitamin D₃-Gehalten in einer Größenordnung $< 3\ 500$ I.E./kg müssen für die Herstellung der Testrationen unter Umständen sehr hohe Mengen Probenmaterial eingemischt werden. Die Frage nach einer homogenen Verteilung des Probengutes in der Basalration spielt dabei nur noch eine untergeordnete Rolle. Bei Probensollgehalten von $3\ 500$ bzw. 500 I.E. Vitamin D₃/kg müssen in die Testration 110 I.E. Vitamin D₃/kg 3,1% bzw. 21% Probenmaterial eingemischt werden. Bei diesen Einmischungskonzentrationen muß damit gerechnet werden, daß bei sehr einseitig zusammengesetzten Futtermittelproben zusätzlich Stoffe in hoher Konzentration in die Wachtelration gelangen, die das Testergebnis unerkannt beeinflussen können. Zudem ist mit steigenden Probenzusätzen zur Basalration eine gleichzeitige Verdünnung der Grunddiät verbunden. Es ist aber aus Versuchen von ZUCKER et al. (1970) bekannt, daß eine Spannweite der Rohproteinkonzentration von 16-32% und der Calcium- und Phosphorversorgung (Ca 2,0-3,0%, P 0,6-1,02%; Ca/P 1:0,3-1:0,5) die Linearität der Regressionsgeraden nicht stören.

Hohe Einmischungsprozentsätze können unter Umständen dennoch zu einer Beeinträchtigung der Gesamt-Nährstoffversorgung von Wachtelhennen führen und damit das Versuchsergebnis auf unkontrollierbare Weise verfälschen.

Als Begründung dieser Überlegungen mögen die in Versuch VI gemachten Beobachtungen dienen.

Für die Untersuchung der Proben Milchnahrungsmittel für Säuglinge (mit Sollgehalten von 3 000-3 500 I.E. Vitamin D_3 /kg) mußten im Durchschnitt 2,4% Laktose in die Testrationen mit eingemischt werden. Da aber bekannt ist, daß beim Vogel Laktosekonzentrationen in dieser Höhe zu Durchfall führen (näheres s.S.68) muß angenommen werden, daß durch die diätetisch bedingte Enteritis der Versuchstiere der Versuchsfehler wesentlich erhöht wurde.

Ferner ist bekannt, daß Molke als Bestandteil der Basaldiät die Knochenverkalkung verbessert. Dieser Befund wird entweder auf eine verbesserte Vitamin D_3 -Wirkungsweise oder auf eine Vitamin D_3 -unabhängige Erhöhung der Calciumresorption zurückgeführt (21). Daraus folgt eine Störung der Beziehung Eischalentrockensubstanzausscheidung zu Vitamin D_3 -Konzentration im Futter. In Versuch VI wurde beobachtet, daß die Testdosierung mit 110 I.E. Vitamin D_3 /kg in der Regel zu besseren Ergebnissen (Eischalentrockengewicht/Tier und Tag) führte, als aus den Werten für die Dosis 170 I.E. Vitamin D_3 /kg hätte erwartet werden können. Diese Beobachtung steht möglicherweise gut im Einklang mit dem oben zitierten Befund. Die Verbesserung der Calcifikation durch Molke (als Bestandteil eines Milchnahrungsmittels) würde gerade bei geringer Vitamin D_3 -Versorgung besonders ins Gewicht fallen.

4.4. Verhalten bei vermuteten Schadfällen:

Ein Vitamin D_3 -Bestimmungsverfahren wird dann für praxisbezogene Untersuchungen besondere Bedeutung erlangen können, wenn mit seiner Hilfe der Vitamin D_3 -Gehalt einer Untersuchungsprobe, auch ohne Angaben des Herstellers über die mutmaßliche Vitamin D_3 -Konzentration der Probe, zuverlässig ermittelt werden kann. Dieser Faktor ist insbesondere im Rahmen der Schadfutterdiagnostik von Bedeutung, da hier mitunter Abweichungen der Vitamin D_3 -Konzentration vom deklarierten Wert auftreten können, die auf verschiedene Ursachen wie etwa zu geringe Einmischung, zu lange oder unsachgemäße Lagerung der Probe zurückzuführen sein können.

Im Wachteltest und wie in jedem biologischen Bestimmungsverfahren werden die Testrationen unter Zugrundelegung des Sollgehaltes der Probe, d.h. der vom Hersteller deklarierten Vitamin D_3 -Konzentration pro kg Futter, hergestellt. Um dennoch den Vitamin D_3 -Gehalt einer Probe sicher feststellen zu können, wird man in all den Fällen, in denen keine oder nur unsichere Angaben über die Vitamin D_3 -Konzentration der zu untersuchenden Probe vorliegen, von verschiedenen Sollgehalten ausgehen müssen. In der Regel wird es genügen, wenn die Zahl der Prüfrationen von 2, die im Normalfall sicher ausreichen, auf 3 oder besser 4 erhöht wird, d.h. wenn verschiedene Sollwerte für die Proben angenommen werden. Durch diese Maßnahme konnte der tatsächliche Vitamin D_3 -Gehalt eines Schadfutters (Legehennenalleinfutter in Versuch III), dessen Vitamin D_3 -Konzentration die Angaben des Herstellers um mindestens 11% unterschritten hatte, zuverlässig mit einem relativ geringen Titer-Variationskoeffizienten ($\pm 13\%$) ermittelt werden.

In Versuch V wurde der Sollgehalt eines Mineralfutters für Schweine mit 60 000 I.E. Vitamin D_3 /kg bei Bildung der Testrationen zugrundegelegt. Als Ergebnis des Bestimmungsverfahrens konnten jedoch nur 27 600 I.E. Vitamin D_3 /kg ausgewiesen werden, was einem Untergehalt der Probe an Vitamin D_3 von $>50\%$ entsprach. Der Variationskoeffizient des Titers lag mit $\pm 31\%$ sehr hoch, was in Anbetracht der großen Abweichung des Sollgehaltes vom tatsächlich ermittelten Vitamin D_3 -Gehalt der Probe nicht überraschen darf. Es kann angenommen werden, daß eine Erhöhung der Anzahl der Prüfrationen, unter Annahme eines Probengehaltes von 30 000 I.E. Vitamin D_3 /kg, mit hoher Wahrscheinlichkeit einen geringeren Standardfehler des Titers bewirkt hätte.

Da man bei der Vitamin D_3 -Bestimmung in Schadfutterproben mit einer vermehrten Anzahl von Testdosierungen rechnen muß, empfiehlt es sich, frühzeitig für die Bereitstellung einer ausreichenden und gegenüber dem Normalfall erhöhten Probenmenge Sorge zu tragen.

4.5. Futterverzehr, Körpergewichtsentwicklung und Tierverluste:

In 6-tägigen Intervallen wurden in allen Versuchen (außer Versuch IVA) der Futterverzehr/Tier und Tag bestimmt. Es zeigte sich, daß in keiner Untersuchung eine nachweisbare Beziehung zwischen Vitamin D_3 -Angebot aus den Rationen und dem Futterverzehr bestand.

Dagegen ließen die Verzehrdaten von Versuch VII bei Versuchsbeginn und Versuchsende erkennen, daß im Laufe der Untersuchung der Futterverzehr in den einzelnen Rationsgruppen anstieg (von 17, 18 in der ersten 6-Tage-Periode auf 21, 22 g/Tier und Tag in der letzten 6-Tage-Periode). Dies entspricht in gewisser Weise auch den Ergebnissen anderer Untersucher, die mit fortschreitender Dauer der Vitamin D_3 -Mangelperiode (Depletion) ein Absinken des Futterverzehrs beobachteten.

Die in Versuch VII vorgelegene steigende Futteraufnahme, würde eigentlich als Folge der Repletion auch erwarten lassen, daß ein ähnliches Verhalten der Körpergewichtsentwicklung aufgefunden wird. Die in wöchentlichen Abständen vorgenommenen Gruppenwiegungen bestätigten diese Vermutung jedoch nicht. Auch war keine Beziehung zwischen den einzelnen Futterrationen und der Körpergewichtsentwicklung festzustellen. Desgleichen ergab sich kein nachweisbarer Zusammenhang zwischen Tierverlusten und den entsprechenden Futterrationen. Die Mortalitätsrate war in allen Versuchen (9,5%) relativ hoch. Die in allen Rationsgruppen suboptimale Vitamin D_3 -Versorgung war vermutlich nicht weit genug gefächert, um die fraglos bestehende negative Korrelation zwischen Vitamin D_3 -Angebot und Verlustrate deutlich hervortreten zu lassen.

4.6. Schlußfolgerungen:

Bei Verwendung der Streuung um die "mittlere" Regressionsgerade als Kriterium, erwiesen sich die Versuche mit den Standardkonzentrationen 80, 140 und 200 I.E. Vitamin D_3 /kg und einer Meßperiode vom 5.-18. Versuchstag, den anderen geprüften Standardreihen und Versuchsperioden überlegen (vgl.4.2.)

Bei einer mittleren Depletionsdauer von 17 Tagen und einer Versuchsdauer von 18 Tagen beträgt die Gesamt-Testdauer 5 Wochen. Der Nachteil der relativ langen Testdauer ist jedoch gering zu bewerten, da die zum Test herangezogenen Wachtelhennen hinsichtlich Aufzucht, Ernährung und Haltung außerhalb des Testzeitraums keine gesonderten Ansprüche stellen. Für Routine-Testverfahren, bei kontinuierlichem Probeneingang können weitgehend depletierte Wachtelhennen zur Verfügung gehalten werden, so daß unverzüglich mit dem knapp 3 Wochen dauernden Test begonnen werden kann. Dazu kommt noch, daß eine Wachtelhenne durchschnittlich 3 mal als Versuchstier verwendet werden kann.

Der Wachteltest ist weitgehend Vitamin D_3 -spezifisch, da Vitamin D_2 der D_3 -Wirkung etwa 25 fach unterlegen ist (77). Der besondere Vorteil des Wachteltestes gegenüber anderen gebräuchlichen biologischen und chemisch-physikalischen Verfahren liegt darin, daß eine Futterprobe ohne vorherige Behandlung (z.B. Verseifung, Extraktion) als solche auf ihre Vitamin D_3 -Wirksamkeit untersucht werden kann. Vitamin D_3 -Verluste, die gewöhnlich durch die notwendige Aufarbeitung der Untersuchungsproben bedingt sind, treten bei Anwendung des Wachteltestes nicht auf. Weiter muß die außerordentlich leichte Erfäßbarkeit der Versuchskriterien Legeleistung und Eischalencalcifizierung über den gemeinsamen Parameter Eischalentrockenmasse/Tier und Tag betont werden. Durch die einfache Erfäßbarkeit des Versuchskriteriums gewinnt der Test an Genauigkeit. Eine besondere Einarbeitung und Erfahrung für die Untersuchungsperson, wie sie z.B. für den Line-Test, Röntgentest und für die Bestimmung mit Radiophosphor nötig ist, entfällt in weitem Maße. Für die Ausführung des Testes sind keine kostspieligen Apparaturen oder methodisch schwierige Analysenverfahren notwendig.

Wie in allen gängigen biologischen Vitamin D_3 -Bestimmungsverfahren wird auch hier die physiologische Wirkung eines Gemisches von synergistisch und antagonistisch wirkenden Stoffen bestimmt, d.h. es wird die resultierende Vitamin D_3 -Wirksamkeit einer Probe ermittelt, die ja bei der Untersuchung von Futterproben und Lebensmitteln auch am meisten interessiert.

Der Hauptanwendungsbereich des Wachteltestverfahrens dürfte in der Vitamin D_3 -Bestimmung von Mischfutterproben, bestimmten Einzelfutter- und auch Lebensmitteln liegen.

5.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung des Wachteltestverfahrens zur Vitamin D_3 -Bestimmung überprüft werden. Das Wachtelverfahren beruht auf der Beobachtung, daß bei ausreichend depletierten Wachtelhennen über einen bestimmten Zeitraum eine lineare Beziehung zwischen Vitamin D_3 -Konzentration im Futter und der Eischalentrockenmasseausscheidung/Tier und Tag besteht.

Für die Dauer eines 18- (12 bzw. 15) täglichen Versuchszeitraums wurden 3 Standardrationen mit 80, 140 und 200 (100, 200, 300 bzw. 80, 160, 240) I.E. Vitamin D_3 /kg einer einfachen methioninergänzten Mais-Soja-Basalration angeboten. Die Eischalentrockenmasseausscheidung wurde in 2-tägigen Abständen bestimmt und aus dem Mittel der Versuchsperiode als Eischalentrockenmasseausscheidung/Tier und Tag angegeben. Die Ergebnisse wurden als Punkte in ein Koordinatensystem (x-Achse: Vitamin D_3 -Konzentration im Futter; y-Achse: Eischalentrockengewicht/Tier und Tag) eingetragen und durch eine Regressionsgerade verbunden. Die zur Untersuchung anstehenden Proben wurden unter Zugrundelegung des deklarierten Vitamin D_3 -Gehaltes so in die Vitamin D_3 -arme Basalration eingemischt, daß bei Verwendung der Vitamin D_3 -Standard-konzentrationsreihe 80, 140, 200 (100, 200, 300 bzw. 80, 160, 240) I.E. Vitamin D_3 /kg, Testrationen mit Vitamin D_3 -Sollgehalten von 110 und 170 (150, 250 bzw. 120, 200) I.E./kg entstanden.

Die Versuchsauswertung erfolgte graphisch bzw. nach einem statistischen Modell durch Vergleich der Steigungskoeffizienten von Standard- und Testgeraden.

In insgesamt 10 Versuchen wurden 14 Proben (10 Mischfuttermittel und 4 Milchnahrungsmittel für Säuflinge) auf ihren Vitamin D_3 -Gehalt untersucht. Die Tierzahl/Rationsgruppe variierte in den Standardgruppen von 4x3 bis 8x3 Wachtelhennen, in den Prüfgruppen zwischen 4x3 und 10x3 Tieren.

Ergebnisse:

Für 8 Mischfuttermittel deren Vitamin D₃-Konzentrationen zwischen 700 und 80 000 I.E./kg lagen, standen die tierexperimentell ermittelten Werte in brauchbarer Übereinstimmung zu den Gehaltsangaben der Hersteller.

Im einzelnen wurden folgende Vitamin D₃-Konzentrationen/kg Futter bestimmt:

- 84 000 bzw. 93600 I.E. für ein Mineralfutter f. Rinder
(Soll: 80 000 I.E. Vitamin D₃/kg)
- 8 640 bzw. 11 440 I.E. für ein Eiweißkonzentrat f. Schweine
(Soll: 8 000 I.E. Vitamin D₃/kg)
- 6 060 I.E. für ein Ergänzungsfutter f. Kälber
(Soll: 6 000 I.E. Vitamin D₃/kg)
- 3 125 I.E. für ein Milchaustauschfutter f. Kälber
(Soll: 3 000 I.E. Vitamin D₃/kg)
- 2 940 I.E. für ein Putenstarterfutter
(Soll: 3 000 I.E. Vitamin D₃/kg)
- 2 131 I.E. für ein Legehennenmehl
(Soll: 1 920 I.E. Vitamin D₃/kg)
- 1 090 I.E. für ein Junghennenalleinfutter
(Soll: 1 000 I.E. Vitamin D₃/kg)
- 752 I.E. für ein Schweinemastfutter I
(Soll: 700 I.E. Vitamin D₃/kg)

Der Variationskoeffizient des Proben titers (Titer x Sollgehalt = ermittelte Vitamin D₃-Konzentration) lag zwischen $\pm 5\%$ und $\pm 19\%$.

In 2 Fällen konnte der angegebene Vitamin D₃-Gehalt nicht bestätigt werden. Für ein Legehennenfutter (Soll: 1 000 I.E. Vitamin D₃/kg) wurde eine Vitamin D₃-Konzentration von 708 I.E./kg gefunden. Für eine Probe Mineralfutter f. Schweine (Soll: 60 000 I.E. Vitamin D₃/kg) ergab die Untersuchung einen Gehalt von 27 600 I.E. Vitamin D₃/kg.

Aus der Streuung des Titers lassen sich die Konfidenzgrenzen errechnen, innerhalb derer sich mit $P < 5\%$ der wahre Vitamin D₃-Gehalt der Probe bewegt. Daraus ergab sich, daß die Probe Legehennenfutter (Konfidenzbereich: 520-890 I.E. Vitamin D₃/kg) und die Probe Mineralfutter f. Schweine (Konfidenzbereich: 9 948-45 624 I.E. Vitamin D₃/kg) den deklarierten Gehalt um mindestens 11% bzw. 24% unterschritten. Der Variationskoeffizient des Titers lag hier bei 13% bzw. 31%.

Das Testverfahren erwies sich in allen Fällen als leicht und sicher in der Anwendung. Bei 4 von 14 Proben führte allerdings erst der Wiederholungsversuch zu einer statistisch zuverlässigen Schätzung der Vitamin D_3 -Bestimmung. Die Gründe hierfür werden diskutiert.

Der Vorteil des Testverfahrens liegt in der leichten Erfassbarkeit und Objektivierung der Versuchs-kriterien und im Wegfall umständlicher und zeitraubender Probenaufarbeitungs-fahren.

Der Hauptanwendungsbereich des Wachteltestverfahrens dürfte in der Vitamin D_3 -Bestimmung von Mischfutterproben, bestimmten Einzelfutter- und auch Lebensmitteln liegen.

S U M M A R Y

In this work the applicability of quail bioassay for determination of vitamin D₃ has been investigated.

The quail bioassay is based on the observation, that with regard to vitamin D₃-depleted quails, a linear relation-ship, over a period of time, exists between the vitamin D₃ concentration of the feed and the weight of the egg shell dry matter/hen and day.

For a period of an 18 day test period (12 or 15 days), three standard diets with 80, 140 and 200 (100, 200, 300 or 80, 160, 240) I.C.U.^{x)} vitamin D₃/kg of a methionine supplemented (corn-soy) basal diet are fed to the female quails. During the test period, the weight of the egg shell dry matter is determined at intervals every 2 days. The average drawn from these results is specified as excretion of egg shell dry matter/hen and day. The results are then placed on a graph (the vitamin D₃-concentration of the feed is placed on the abscissa, and the weight of the egg shell dry matter on the ordinate). The regression line is drawn.

The material to be tested is added to the basal diet in such amounts, that by using standard diets with 80, 140 and 200 (100, 200, 300 or 80, 160, 240) I.C.U. vitamin D₃/kg, test diets with a vitamin D₃ content of about 110 and 170 (150, 250 or 120, 200) I.C.U./kg are obtained.

The results can be evaluated using graphs or a statistical model by comparing the correlation coefficients of the regression- and the test line.

In 10 experiments the vitamin D₃ concentration of 14 test materials (10 mixed feedstuffs and 4 baby foods) was determined. The number of quails/ration group varied from 4x3 to 8x3 quails in the standard groups whereas 4x3 and 10x3 in the test groups.

x)¹ I.C.U. = international chicken unit = 0,025 mcg Cholecalciferol

Results:

The results of 8 feed mixtures with vitamin D₃ concentrations between 700 and 80 000 I.C.U. vitamin D₃/kg, obtained in the quail bioassay, showed a good agreement with the vitamin D₃ concentrations (nominal value) as declared by the producer.

In detail, the following vitamin D₃ contents/kg feed were determined:

- 84 000 or 93 600 I.C.U. for a mineral feed for cows
(nominal value: 80 000 I.C.U. vitamin D₃/kg)
- 8 640 or 11 440 I.C.U. for a protein concentrate for pigs
(nominal value: 8 000 I.C.U. vitamin D₃/kg)
- 6 060 I.C.U. for a milk replacer, with a high level of fat, antibiotics and vitamins for supplementing skim milk for calves
(nominal value: 6 000 I.C.U. vitamin D₃/kg)
- 3 125 I.C.U. for a milk replacer for calves
(nominal value: 3 000 I.C.U. vitamin D₃/kg)
- 2 940 I.C.U. for a turkey-starter diet
(nominal value: 3 000 I.C.U. vitamin D₃/kg)
- 2 131 I.C.U. for a layer diet
(nominal value: 1 920 I.C.U. vitamin D₃/kg)
- 1 090 I.C.U. for a developer diet for replacement pullet
(nominal value: 1 000 I.C.U. vitamin D₃/kg)
- 752 I.C.U. for a pig grower diet
(nominal value: 700 I.C.U. vitamin D₃/kg)

The variation coefficients for the titer of the test material (titer x nominal value = determined vitamin D₃ concentration) ranged between $\pm 5\%$ and $\pm 19\%$.

In 2 cases no agreement existed between the declared nominal value of the test material and the estimated vitamin D₃ concentration. The vitamin D₃ content of a laying-diet (nominal value: 1 000 I.C.U. vitamin D₃/kg) was evaluated with 708 I.C.U./kg. The vitamin D₃ concentration for a mineral feed for pigs (nominal value: 60 000 I.C.U. vitamin D₃/kg) was ascertained to be 27 600 I.C.U./kg. The limits of confidence ($P < 0,05$) were calculated with the help of the standard deviation of the titer. The determined vitamin D₃ concentrations for the laying-diet (limits of confidence: 520-890 I.C.U.) and the mineral feed for pigs (limits of confidence: 9 048-45 624 I.C.U.) ranged from at least 11% to 24% below the nominal value. The variation coefficients were evaluated with $\pm 13\%$ or $\pm 31\%$.

The quail bioassay has proved to be an easy and reliable method in all experiments. However, 4 from out of 14 test materials, only the repetition of the experiment allowed a statistical evaluation of the vitamin D_3 concentration. The causes are discussed.

The advantage of this quail bioassay consists in the simple recording of the test criterions, and that no complicated and time-consuming procedures for preparation of the test material are involved.

The quail bioassay should be mainly applied to determine the vitamin D_3 content of mixed feed, of certain feed- and foodstuffs.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ACKERMANN, H.; Methode zur biologischen Bestimmung des Vitamin D (prophylaktischer Röntgentest).
Nahrung 4, 164 (1960)
2. AVIOLI, L.V., S.W.LEE; Detection of nanogram quantities of Vitamin D by gas-liquid chromatography.
Anal.Biochem. 16, 193 (1966)
3. BEKEMEIER, H.; Vitamin D der Haut
Bildung und biologisches Verhalten.
Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart (1966)
4. BEKEMEIER, H.; Ein prophylaktischer Röntgentest zur biologischen Bestimmung von Vitamin D.
Acta biol.med.germ. 4, 283 (1960)
5. BLISS, C.J., P.GYÖRGY; The Animal Vitamin Assays.
aus: Vitamin Methods, Volume II
P.György, Academic Press Inc.
Publishers New York (1951), S.97
6. BLUNK, K.; Ein Beitrag zur biologischen Vitamin-D-Bestimmung im Rattentest.
Diss.agr., Kiel (1951)
7. BLUNT, J.W., H.F.DeLUCA, and H.K.SCHNOES;
25-Hydroxycholecalciferol. A Biologically Active Metabolite of Vitamin D₃.
Biochemistry, 7, 3317-3322 (1968)
8. BOILLJGER, F.R.; Vitamine D
aus: Dünnschicht-Chromatographie, E.Stahl
Springer-Verlag, 1.Auflage (1962) S.231
9. BOMSKOV, C.; Methodik der Vitaminforschung.
Georg Thieme Verlag, Leipzig 1.Auflage (1935)

10. BROCKMANN, H., Y.H.CHEN; Über eine Methode zur
quantitativen Bestimmung von Vitamin D.
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 241, 129 (1936)
11. BRÜGGEMANN, J., K.BLUNK, W.KRAUSS, H.KARG;
Beitrag zur Vitamin D-Bestimmung.
Die Pharmazie 9, 446-452 (1954)
12. BRÜGGEMANN, J., W.KRAUSS, J.TIEWS;
Zum Mechanismus der Reaktionen von Vitamin A
und D bzw. β -Carotin mit Metallhalogeniden,
insbes. Antimonchloriden.
Chem.Berichte 85, 315 (1952)
13. BRÜGGEMANN, J., W.KRAUSS, J.TIEWS;
Zur Methodik der chemischen Vitamin A- und
Vitamin D-Bestimmung mit elektrophilen Metallhalogeniden.
I. Allgemeines und Methodik mit Antimonpentachlorid.
Z.f.anal.Chem. 135, 241 (1953)
14. BRÜGGEMANN, J., W.KRAUSS, J.TIEWS;
Zur Methodik der Bestimmung des Vitamin A und D
sowie des β -Carotins mit Metallhalogeniden.
II. Allgemeine meßtechnische Grundlagen der
Vitamin A-Metallhalogenidmethoden.
Z.f.anal.Chem. 137, 421-433 (1953)
15. BRÜGGEMANN, J., W.KRAUSS, J.TIEWS;
Zur Methodik der chemischen Vitamin A- und D-
Bestimmung mit elektrophilen Metallhalogeniden.
III. Zur Bestimmung von Vitamin A mit FeCl_3 .
Z.f.anal.Chem. 141, 161 (1954)
16. BRÜGGEMANN, J., W.KRAUSS, J.TIEWS;
Zur Methodik der chemischen Vitamin A- und D-
Bestimmung mit elektrophilen Metallhalogeniden.
IV. Verfahrensvorschläge zur chem. Vitamin A-Bestimmung mit elektrophilen Metallhalogeniden im biologischen Material.
Z.f.anal.Chem. 141, 173 (1954)

17. CARR, F.H., E.A.PRICE;
Colour reactions attributed to vitamin A.
Biochem.J. 20, 497 (1926)
18. CAVALLI-SFORZA, L.; Biometrie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 2.Auflage (1969)
19. CFANG, S.K., J.McGINNIS; Vitamin D Deficiency in
Adult Quail and Chickens and Effects of
Estrogen and Testosterone Treatments.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 124, 1131 (1967)
20. CHEN, P.S.jr., H.B.BOSMAN; Effects of Vitamin D₂ and D₃ on
Serum Calcium and Phosphorus in Rachitic Chicks.
J.Nutr. 83, 133 (1964)
21. CORRADINO, R.A., R.H.WASSERMANN, M.H.PUBOLS, S.I.CHANG;
Vitamin D₃ induction of a calcium-binding protein
in the uterus of the laying hen.
Arch.Biochem.Biophys. 125, 378 (1968)
22. DECFENE, E.B.; Determination of Vitamin D by isomerization.
J.Pharm.Pharmacol. 16, 158-162 (1964)
23. De LUCA, H.F.; Recent advances in the metabolism and
function of Vitamin D.
Federation Proceedings 28, 1678 (1969)
24. De LUCA, H.F.; Active Compounds S.220-239
Biochemical Systems S.240-247
aus: The Vitamins, Volume III
W.H.Sebrell, Jr. und R.S.Harris
Academic Press, New York & London 2.Auflage (1971)

25. De LUCA, H.F., R.H.WASSERMANN, D.SCHACHTER, E.KODICEK,
J.W.BLUNT; Vitamin D
aus: The Fat-Soluble Vitamins,
De Luca, H.F. and J.W.Suttie
The University of Wisconsin Press, Madison,
Milwaukee and London (1970) S.3-93
26. De MAN, T.J.; Swine and Beef Cattle Nutrition.
Seminar, Kansas City (1967),
zit. nach Pfizer, Informationen-Tierproduktion (1967)
27. De WITT, J.B., M.X.SULLIVAN;
Spectrophotometric Procedure for Quantitative
Estimation of Vitamin D.
Ind.Eng.Chem.Analyt.Ed. 18, 117 (1946)
28. EDLUND, D.O., J.R.ANFINSEN;
Gas-liquid chromatographic procedure for the
determination of Vitamin D₂ in multiple-vitamin
tablets and raw materials.
J.Assoc.Off.Anal.Chem. 53, 287-293 (1970)
29. EVANS, R.J., J.L.St.JOHN;
Modifications of A.O.A.C. chick method of
Vitamin D assay.
J.Assoc.Official Agr.Chem. 27, 283-289 (1944)
30. FRASER, D.R., KODICEK E.;
Unique Biosynthesis by Kidney of a Biologically
Active Vitamin D Metabolite.
Nature 228, 764 (1970)
31. GASSMANN, B.; Über Vor- und Nachteile der chemischen
Vitaminbestimmung.
Ernährungsforschung 3, 300 (1958)
32. GEBAUER, H.; Vor- und Nachteile des biologischen
Vitamin-Testes.
Ernährungsforschung 3, 289 (1958)

33. GSTJNFR, F.; Chemisch- physikalische Vitamin-
Bestimmungsmethoden.
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart,
5. neubearbeitete Auflage (1965) S.673
34. GROFF, J., H.ZUCKER; Vitamin D₃-Bedarfsstudien an der
japanischen Wachtel.
Z.Tierphysiol.Tierernährg.Futtermittelkde. 25,121(1969)
35. HOEFMANN, J.H.; Untersuchungen über den Vitamin D₃-
Bedarf der japanischen Wachtel.
Vet.med.Diss., München (1971)
36. HOLICH, M.F., H.K.SCHNOES, and H.F.DeLUCA;
Identification of 1, 25-Dihydrocholecalciferol,
a Form of Vitamin D₃ Metabolically Active in the
Intestine.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 68, 803 (1971)
37. JANECKE, H., R.BRENDEL;
Zur Bestimmung von Vitamin D in biologischem
Material (Milch).
Naturwissenschaften 58, 54-55 (1971)
38. JELINEK, V.; Biologische Methoden
aus: Vitamine, Chemie und Biochemie, Band I
J.Fragner, VEB Gustav Fischer Verlag Jena (1964) S.678
39. KARG, H.; Untersuchungen über den Vitamin D-Gehalt der
Milch unter besonderer Berücksichtigung seiner
analytischen Feststellung.
Vet.med.Diss., München (1953)
40. KNOBLOCH, E.; Physikalische Methoden
aus: Vitamine, Chemie und Biochemie, Band I
J.Fragner, VEB Gustav Fischer Verlag Jena (1964)S.673

41. KODICEK, E., D.R.ASHBY;
Paper Chromatography of Vitamin D and other Sterols.
Biochem.J. 57, XII (1954)
42. KODICEK, E., D.R.ASHBY;
The Estimation of Vitamin D by Paper Chromatography.
Biochem.J. 57, XIII (1954)
43. KODICEK, E., D.E.LAWSON; Vitamin D
aus: The Vitamins, Volume VI
P.György und W.N.Pearson
Academic Press, New York & London (1967) S.211
44. LEFMANN, H.G., K.STICH;
Über eine einfache und rasche, quantitative Bestimmung von Vitamin D₂ oder D₃.
Helv.Chim.Acta 45, 1275 (1962)
45. LOPUCHOVSKY, J.; Príspevok hodnoteniu biologickej aktivity vitamínu D pomocou biologických testov u kurčiat. (Evaluation of biological activity of Vitamin D by biological tests with chicks).
Folia vet.Košice 11, 171-181 (1967)
46. MARTIN, D.L., M.J.MELANCONjr., DeLUCA H.F.;
Vitamin D stimulated, calcium- dependent adenosine triphosphatase from brush borders of rat small intestine.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 35, 819-823 (1969)
47. McCOLLUM, E.V., N.SIMMONDS, J.BECKER, P.G.SHIPLEY;
Studies on experimental rickets. XXIII.
The production of rickets in the rat by diets consisting essentially of purified food substances.
J.Biol.Chem. 54, 249 (1922)

48. MURRAY, T.K., P.FRDODY, T.PANALAKS;
Determination of Vitamins D₂ and D₃ in pharmaceuticals by Gas-Liquid Chromatography,
J.Assoc.Off.Anal.Chem. 51, 839-842 (1968)
49. MURRAY, T.K., K.C.DAY, E.KODICEK;
The Differentiation and Assay of Vitamin D₂ and D₃ by Gas-Liquid Chromatography.
Biochem.J. 98, 293 (1966)
50. NAIR, P.P., C.BUCANA, S.LEON, D.A.TURNER;
Gas Chromatographic Studies of Vitamins D₂ and D₃.
Anal.Chem. 37, 631 (1965)
51. NIELD, C.H., W.C.RUSSELL, A.ZIMMERLI;
The spectrophotometric Determination of Vitamins D₂ and D₃.
J.Biol.Chemistry 136, 73 (1940)
52. O'BRIEN, B., K.MORGAREIDGE;
The effect of phosphorus on the biological estimation of vitamin D activity.
J.Nutr. 18, 277-284 (1939)
53. PANALAKS, T.; A Gas-chromatographic Method for the Determination of Vitamin D in Fortified Non-fat Dried Milk.
Analyst 95, 862-867 (1970)
54. PINELLI, A., F.WITZLE, P.P.NAIR;
Separation of Vitamin D from cholesterol by thin-layer chromatography.
J.Chromatography 42, 271-274 (1969)
55. PONCHON, G., F.X.FELLERS;
Thin-layer chromatography of vitamin D and related sterols.
J.Chromatography 35, 63-65 (1968)

56. REMP, D.G., J.H. MARSHALL;
The antirachitic activity of various forms
of vitamin D in the chick.
J.Nutr. 15, 525 (1938)
57. RICHTER, J., D. ROTTE;
Die Bestimmung von Vitamin D in Naturprodukten
und pharmazeutischen Präparaten mit Hilfe der
Dünnschichtchromatographie.
Die Pharmazie 10, 601-606 (1969)
58. SACHS, L.; Statistische Auswertungsmethoden
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
3. neubearbeitete Auflage (1971) S.320
59. SAHASHI, Y., T.SUZUKI, M. HIGASHI;
Metabolism of Vitamin D in animals.
V. Isolation of vitamin D sulfate from mammalian
milk.
J.Vitamin (Kyoto) 13, 41-106 (1967)
60. SCHEUNERT, A., A.TRAUTMANN; Lehrbuch der Veterinärphysio-
logie.
Verlag Paul Parey, Hamburg-Berlin,
5. Auflage (1965) S. 123
61. SCOTT, M.L., M.C. NESHEIN, R.J. YOUNG;
Nutrition of the chicken.
M.L. Scott and Associates, Ithaca, New York (1969)
62. SYNDER, R.H., H.J. EISNER, H. STEENBOCK;
The Determination of Vitamin D with Radio-
phosphorus.
J.Nutr. 51, 45 (1951)
63. STEENBOCK, H., A. BLACK; Fat soluble vitamins XXIII
The induction of growth-promoting and calci-
fying properties in fats and their unsaponifiable
constituents by exposure to light.
J.Biol.Chem. 64, 263 (1925)

64. TAYLOR, A.N., R.F.WASSERMAN;
Vitamin D₃-Induced Calcium-Binding Protein:
Partial Purification, Electrophoretic Visualization,
and Tissue Distribution.
Arch.Biochem.Biophys. 119, 536-540 (1967)
65. TIEWS, J.; Studien zur Kenntnis des Reaktionsmecha-
nismus und der Methodik der chemischen Bestimmung
von Vitamin A, β -Carotin und Vitamin D mit
Antimonchlorid.
Diss.agr. Kiel (1951)
66. TIEWS, J., H.ZUCKER, J.GROPP; Futterbedingte
Schadensfälle in der Tierernährung.
Tierärztl.Umschau 24, 467 (1969)
67. TSCHAPPE, H., H.PLESSING; Chemische Vitamin D-Bestimmung
mit Zinn-(II)-chlorid.
Naturwissenschaften 24, 417 (1955)
68. TURK, J.I., J.MCGINNIS;
Influence of Vitamin D on Various Aspects of the
Reproductive Process in Mature Hens.
Poultry Sci. 43, 539 (1964)
69. VERLOOP, A., A.L.KOEVOET, E.HAVINGA;
Studies on Vitamin D and related compounds III.
Short communication on the cis-trans isomerization
of calciferol and the properties of "trans"-Vitamin D₂
Rec.Trav.Chim.Pays-Bas. 74, 1125 (1955)
70. WARYANY, J., H.F.MABON;
Estimation of Vitamin D in blood serum.
Amer.J.Dis.Child 60, 606 (1940)

71. WILSON, W.O., K.K.ABBOT, H.ABPLANALP;
Evaluation of coturnix (Japanese Quail) as
pilot animal for poultry.
Poultry Sci. 40, 651 (1961)
72. WINDAUS, A., M.DEFFKE, C.ROOSEN-RUNGE;
Über die Pyro-vitamine D₃ und ihre Dehydro-
derivate.
Liebigs Ann.Chem. 1, 537 (1938)
73. WINDAUS, A., O.LINSERT, A.LÜTTRINGHAUS, G.WEIDLICH;
Über das krystallisierte Vitamin D₂.
Liebigs Ann.Chem. 492, 226 (1932)
74. ZIFFER, H., W.J.A.VANDEN-HEUVEL, E.O.A.HAAHTI, E.C.HORNING;
Gas chromatographic behavior of vitamins D₂ and D₃.
J.Amer.Chem.Soc. 82, 6411 (1960)
75. ZUCKER, H., J.GROPP, J.PEH, Ch.ZENTZ;
Erfahrungen mit der japanischen Wachtel (cot.cot.
jap.) als Labortier sowie einige Ergebnisse von
Nährstoffbedarfsuntersuchungen.
Tierärztl.Umschau 8, 416 (1967)
76. ZUCKER, H., J.GROPP;
Vitamin D₃-Bestimmung über die Eischalenbildung
bei der Japanischen Wachtel.
Naturwissenschaften 55, 447 (1968)
77. ZUCKER, H., J.GROPP, J.HOFMANN, H.HARDEN;
Beitrag zur Vitamin D-Versorgung der Japanischen
Wachtel (Coturnix coturnix japonica).
II. Einfluß der Vitamin D₃-Versorgung von Wachtel-
hennen auf das Eischalencalcium.
Nicht veröffentlichte Ergebnisse (1970).

L e b e n s l a u f

Am 22. Oktober 1944 wurde ich, Manfred Baumeister, als Sohn des Landwirts Konrad Baumeister und seiner Ehefrau Mathilde, geb. Wiedmann, in Dürnau geboren. Nach fünf Jahren Besuch der Volksschule in Dürnau trat ich in das Progymnasium Bad Buchau ein. Nach Wechsel an das Gymnasium Saulgau legte ich 1965 die Reifeprüfung ab.

Nach 2-jähriger Dienstzeit bei der Bundeswehr wurde ich im März 1967 als Leutnant der Reserve entlassen.

Im Sommersemester 1967 begann ich das tierärztliche Studium an der Universität München, im Frühjahr 1972 schloß ich es hier mit dem Staatsexamen ab. Im Mai 1972 wurde mir die Bestallung als Tierarzt erteilt.

Die Arbeiten zu vorliegender Dissertation wurden im Frühjahr 1969 an den Instituten für Tierphysiologie und Ernährungsphysiologie in der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München begonnen.

Im Anschluß an die Arbeit möchte ich
Herrn Prof.DDr.DDr.h.c. J. Brüggemann
und Herrn Prof.Dr.Dr. J. Tiews
sehr herzlich für die Überlassung des
Themas danken.

Gleichzeitig danke ich
Herrn Dr. J. Gropp
für die Unterstützung und Förderung
meiner Arbeit.

